Zur Bioverfügbarkeit von Co-trimoxazol

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Friedhelm Repnik
aus Konstanz

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0017

Zur Bioverfügbarkeit von Co-trimoxazol

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Friedhelm Repnik
aus Konstanz

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.Mai 1980
Dekan: Prof.Dr.M.Hanack
1.Berichterstatter: Prof.Dr.K.-A.Kovar
2.Berichterstatter: Prof.Dr.H.Auterhoff

Die vorliegende Arbeit wurde im September 1977 unter Anleitung von Professor Dr. K.-A.Kovar am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Februar 1980 abgeschlossen.

Für die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. K.-A.Kovar sehr herzlich.

Dem Direktor des Pharmazeutischen Institutes, Herrn Professor Dr. H.Auterhoff, danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Meiner Frau und meinen Kindern danke ich für die Geduld,
die sie mir während dieser Zeit oft entgegenbringen mußten.

Inhaltsangabe

Seite

I. Einleitung..... 1

II. Entwicklung einer analytischen Methode zum Nachweis von Co-trimoxazol im Serum und im Harn..... 6

1. Übersicht über bisherige Bestimmungsmethoden..... 6

2. Ausarbeitung einer simultanen HPLC-Bestimmung..... 12

2.1. Trennung aus wäßriger Lösung..... 12

2.2. Trennung im Serum neben N-4-Acetylsulfamethoxazol..... 21

2.2.1. Probenvorbereitung..... 21

2.2.2. Optimierung des Fließmittels..... 27

2.2.3. Festlegung der Meßwellenlänge..... 43

3. Trennung im Harn vor und nach saurer Hydrolyse..... 49

4. Zuverlässigkeit der Methode..... 52

5. Vergleich mit anderen HPLC-Methoden..... 55

III. Bestimmung zur biologischen Verfügbarkeit..... 57

1. Blutspiegelbestimmung..... 57

1.1. Versuchsdurchführung..... 57

1.2. Kreatininwerte im Serum..... 58

1.3. Auswertung der Ergebnisse..... 59

1.3.1. Meßwerte..... 59

1.3.2. Eliminationsgleichungen..... 63

1.3.3. Blutspiegel-Zeit-Kurven..... 65

1.3.4. Biologische Verfügbarkeit im Serum..... 68

1.3.5. Eliminationshalbwertszeiten..... 68

2. Kumulative Urinausscheidung..... 69

2.1. Versuchsdurchführung..... 69

2.2. Kreatininwerte im Harn..... 70

2.3. Auswertung der Ergebnisse..... 72

Seite

3. Diskussion der Ergebnisse..... 77

IV. Zusammenfassung..... 80

V. Experimenteller Teil..... 82

VI. Literaturverzeichnis..... 106

I. Einleitung

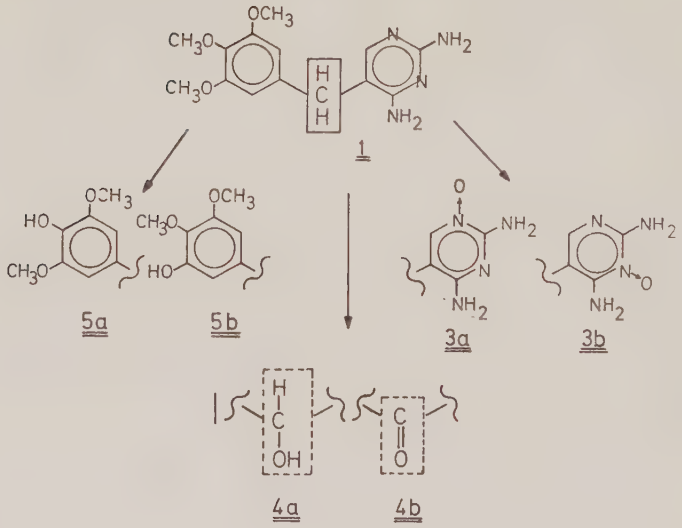
Zu der Gruppe der heute weitest verbreiteten Chemotherapeutika gehört Co-trimoxazol. Dabei handelt es sich um ein Kombinationspräparat aus Trimethoprim (1)(2,4-Diamino-(3,4,5-trimethoxybenzyl-)5-pyrimidin) und Sulfamethoxazol (2)(N-1-(5-Methylisoxazolyl-)3-sulfanilamid) im Verhältnis 1:5.

Das Prinzip des Wirkungsmechanismus liegt darin, daß zwei aufeinanderfolgende bakterielle Stoffwechselvorgänge gestört werden. Die Wirkung von Trimethoprim beruht auf der spezifischen Hemmung der bakteriellen Dihydrofolsäurereduktase, einem Enzym, das die NADPH - abhängige Reduktion der Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure bewirkt. Die Tetrahydrofolsäure ist eine für den Menschen und viele Bakterien lebensnotwenige Substanz. Sie ist ein Co-Enzym, das bei der Biosynthese von Thymidin und Purinen eine wichtige Rolle spielt. Von quantitativ größter Bedeutung ist die Beteiligung an der Thymidin Biosynthese, da die Tetrahydrofolsäure hier sowohl gruppenübertragend als auch reduzierend wirkt. Besondere Bedeutung gewinnt diese Enzymblockade bei der Kombination von Trimethoprim mit Sulfonamiden. Die chemotherapeutische Wirkung der Sulfonamide beruht auf einer kompetitiven Verdrängung der p-Aminobenzoesäure im folatsynthetisierenden Enzymsystem. Die p-Aminobenzoesäure ist ein Bestandteil der Folsäure.

Diese doppelte, stufenweise Blockade des Folsäurestoffwechsels führt zu einer Potenzierung. Es kommt zu einer irreversiblen Schädigung der Keime, da die primär nur bakteriostatisch wirksamen Substanzen in der Kombination jetzt einen bakteriziden Effekt haben. Durch diese potenzierende Wirkung ist es möglich, die therapeutischen Dosen der Kombinationspräparate im Vergleich mit den Einzelsubstanzen erheblich zu senken, da die minimale Hemmkonzentration in der Kombination sehr stark herabgesetzt wird.

Trimethoprim soll im 24 Stunden Urin zu 77,5 Prozent unverändert ausgeschieden werden[1]. Folgende Metaboliten konnten bisher sicher identifiziert werden[1,2]:

1. N-1 oder N-3-oxid im Pyrimidinring (3a/3b)
2. Hydroxylierung der Methylenbrücke (4a) und Oxidation zum Keton (4b)
3. Demethylierung im Benzylring (5a/5b)

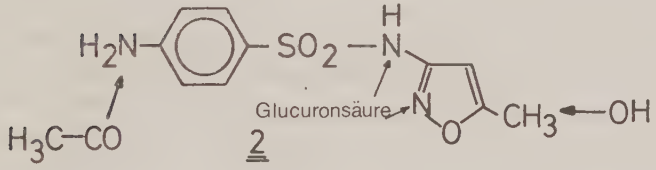


Formelschema der Trimethoprimmetaboliten

Die Metaboliten des Sulfamethoxazols lassen sich in konjugierte und nichtkonjugierte unterteilen. Im 24 Stunden Urin wird Sulfamethoxazol nach Rieder[2] zu 15 % mit Glucuronsäure konjugiert ausgeschieden. Die restlichen 85 % liegen unkonjugiert vor. Sowohl die konjugierten als auch die acetylierten Sulfonamide sind bakteriostatisch inaktiv.

Sicher bekannte Metaboliten sind:

1. nichtkonjugierte:
   N-4-Acetylsulfamethoxazol
   Hydroxylierung der Methylgruppe am Isoxazolring
2. konjugierte:
   Glucuronisierung an N-1
   Glucuronisierung am N des Isoxazolringes



2

Ein wichtiger Parameter der Dosis-Wirkungsbeziehung ist die Bioverfügbarkeit. Bioverfügbarkeit ist im amerikanischen Gesetzblatt definiert als Geschwindigkeit und Ausmaß, mit dem ein aktiver Bestandteil des Arzneimittels resorbiert und am Wirkort verfügbar ist[3]. Da in vielen Fällen der Wirkort nicht exakt bekannt ist, mißt man die Konzentration der Wirksubstanzen im Blut. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in der Regel die Konzentration im Blut mit der Stärke der Wirkung korreliert. Die wichtigste Methode zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit ist die Aufstellung einer Kurve der Konzentration des Arzneistoffes zu verschiedenen Zeiten im Blutplasma z.B. nach Gabe einer Tablette. Durch Division

der Fläche unter dieser Kurve durch die Fläche nach i.v. Gabe derselben Dosis erhält man die absolute Bioverfügbarkeit. Von relativer Bioverfügbarkeit spricht man, wenn man z.B. zwei orale Darreichungsformen miteinander vergleicht.

Eine weitere Methode ist die Messung der kumulativen Urinausscheidung. Hierbei wird die in einem bestimmten Zeitintervall mit dem Harn ausgeschiedene Arzneistoffmenge nach unterschiedlicher Applikation bzw. Darreichungsform bestimmt.

Vergleicht man in der Literatur die Serumkonzentrationen nach Einnahme gleicher Co-trimoxazoldosen, die von mehreren Autoren mit verschiedenen analytischen Methoden gemessen wurden, so fallen die unterschiedlichen Maximalwerte auf. Für Trimethoprim werden von Donike[4] 1,2 µg/ml, von Windorfer[5] 2,0 µg/ml, 2,9 µg/ml und 1,88 µg/ml, Weinfeld[6] 1,26 µg/ml, 1,45 µg/ml bis 1,74 µg/ml - je nach galenischer Zubereitung und Untersuchungsmethode- angegeben, bei Bach[7] schwanken die Werte zwischen 1,64 µg/ml bis 1,72 µg/ml und Schwartz[8] findet 1,42 µg/ml. Die Maximalwerte von Sulfamethoxazol betragen bei Donike 55,6 µg/ml, Windorfer 68,3 µg/ml, 84,2 µg/ml und 86,7 µg/ml, Vree[9] 55 µg/ml, Sigel[10] 52,2 µg/ml, Bach 36-38 µg/ml und Schwartz 56 µg/ml. In den Untersuchungen von Weinfeld und von Bach wird ein und dieselbe Serenreihe nach verschiedenen Methoden gemessen. Windorfer und Weinfeld erstellten Bioverfügbarkeitsstudien verschiedener galenischer Zubereitungen. Nach Windorfer wird Trimethoprim aus der Suspension schlechter resorbiert als aus den Tabletten. Dies überrascht, da aus einer Suspension die Freigabe des Arzneistoffes schneller erfolgen sollte als aus Tabletten.

Die Fragestellung unterschiedlicher biologischer Verfügbarkeit aus verschiedenen galenischen Zubereitungen gewinnt durch das neue Arzneimittelgesetz, das Wirksamkeitsstudien verlangt, und durch die Arbeit der Transparenzkommission besondere Bedeutung.

Unser Ziel war es daher:

1. eine geeignete neue analytische Methode zur Bestimmung von Trimethoprim und Sulfamethoxazol im Serum und Harn zu entwickeln, und
2. eine vergleichende Studie über Blutspiegelkurven und biologische Verfügbarkeit von Co-trimoxazol nach oraler Einnahme von Tabletten und Suspension zu erstellen.

II. Entwicklung einer analytischen Methode zum Nachweis von Co-trimoxazol im Serum und im Harn.

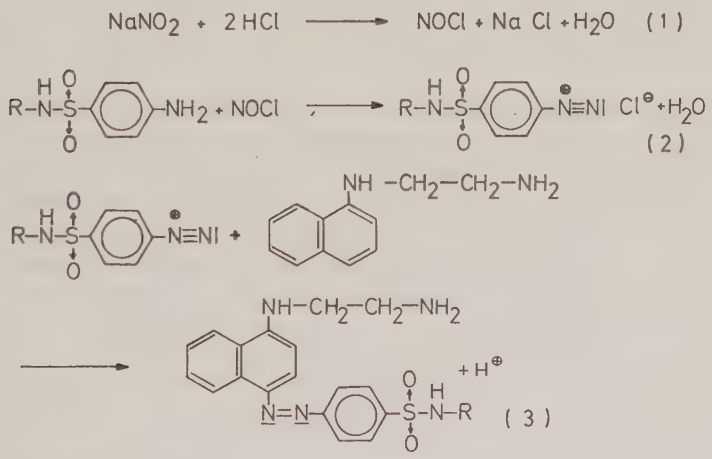
1. Übersicht über bisherige Bestimmungsmethoden

Methoden zur Bestimmung von Trimethoprim

- die fluorimetrische Methode beruht auf der Oxidation des Trimethoprims zur Trimethoxybenzoesäure und anschließender Messung der Fluoreszenz nach vorheriger Extraktion[5,11] und deren Halbautomatisierung nach Kaplan[12].
  Nach einer Extraktion aus alkalischem Milieu mit Chloroform und anschließender Rückextraktion in verdünnte Schwefelsäure wird Trimethoprim mit alkalischer Kaliumpermanganatlösung zu der fluoreszierenden 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure oxidiert. Der Überschuß an Kaliumpermanganat und Braunstein wird mit Formaldehyd entfernt, Trimethoxybenzoesäure mit Chloroform extrahiert und deren Fluoreszenz wird gemessen.
- die gaschromatographischen Methoden nach Extraktion[4,13]
- der mikrobiologische Diffusionstest vergleicht die Wachstumshemmung von Bazillus pumilis mit Standardlösungen[14]
- pulspolarographische Methode beruht auf einer elektrolytischen Reduktion des Pyrimidinringes[15]
- dünnschichtchromatographische Bestimmung des Trimethoprims nach Ausbildung einer Fluoreszenz auf der Platte nach Lichteinwirkung zwischen 24 Stunden und 5 Tagen[16]
- dünnschichtchromatographische Bestimmung durch direkte Messung der Absorption auf der Platte bei 280 nm[10]
- spektralphotometrische Bestimmung neben Sulfamethoxazol durch Absorptionsmessung bei 245 nm[17]
- hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmungsmethoden[6,9,18,19,20,21].

Methoden zur Bestimmung von Sulfamethoxazol

- die spektralphotometrische Bestimmung nach Bratton Marshall[22] ist die meistgebrauchte Methode zur Bestimmung des Sulfamethoxazols.
  Aus Natriumnitrit und Salzsäure bildet sich Nitrosylchlorid (1), dieses reagiert mit der freien Aminogruppe des Sulfamethoxazols zum Diazoniumsalz (2), das durch einen Überschuß an Salzsäure stabilisiert wird. Das Diazoniumsalz kuppelt mit α-Naphthylethylendiamin zum farbigen Azoprodukt (3), dessen Absorption spektralphotometrisch gemessen wird.



Reaktion nach Bratton Marshall auf Sulfonamide.

- UV-Absorptionsmessung neben Trimethoprim bei einer Wellenlänge von 225 nm[17]
- gaschromatographische Bestimmung als N-1-Methylsulfamethoxazol nach Methylierung mit Diazomethan[13]

- dünnschichtchromatographische Bestimmung nach Extraktion und anschließender Direktauswertung der DC-Platten bei 265 nm[10)]
- hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmungsmethoden[9,18,19,20,21,23)]

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungsmethoden

Mit der Entwicklung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) besonders seit der Einführung der Reversed-Phase-Technik (RP) wurden in den letzten Jahren mehrere Bestimmungen erarbeitet[6,9,18,19,20,21,22)].

Tab.1: Übersicht über die derzeit gebräuchlichen HPLC-Bestimmungen von Trimethoprim und Sulfamethoxazol (+) = durchgeführt; (O) = nicht durchgeführt; (o.A.) = ohne Angaben; (s_{rel}) = relative Standardabweichung; (A) = Acetonitril; (E)=Ethanol; (M)=Methanol; (P) = Phosphatpuffer; (PA) = Phosphorsäure; Angaben über die Fließmittelzusammensetzung werden nur bei den Simultanbestimmungen gegeben.

Methode	Bye[18]	Ferry[19]	Bury[20]	Vree[9]	Helboe[21]	Harzer[23]	Weinfeld[6]
biologisches Material	+	+	+	+	O	+	+
Extraktion	+	+	O	O	O	O	+
Proteinfällung	O	O	+	+	O	O	O
Trimethoprinbestimmung	+	+	+	+	+	O	+
Sulfamethoxazolbestimmung	+	+	+	+	+	+	O
Simultanbestimmung	O	+	O	+	+	O	O
Wellenlänge nm	TMP 212 SMZ 270	270	254	225	230	270	254
Wiederfindungsrate Trimethoprim	o.A.	o.A.	95%	83%	o.A.	o.A.	95%
Wiederfindungsrate Sulfamethoxazol	o.A.	o.A.	91%	88%	o.A.	o.A.	o.A.
$S_{rel.}$ Trimethoprim	o.A.	o.A.	3,2%	2%	o,7-1,3%	o.A.	5%
$S_{rel.}$ Sulfamethoxazol	o.A.	o.A.	1,8%	4%	1,1%	o.A.	o.A.
stationäre Phase	Kieselgel	RP	RP 8	RP 8	RP 8	RP 8	Kieselgel
mobile Phase	verschied	M/H_2O +PA	verschied.	E/P 1+4	A/PA 1+3	A/H_2O 1+3	M/H_2O/NH_3/$CHCl_3$
Erfassungsgrenze Trimethoprim/ml	o.A.	o.A.	100-200ng	750ng	o.A.	o.A.	10 ng
Erfassungsgrenze Sulfamethoxazol/ml	o.A.	o.A.	1000ng	500ng	o.A.	o.A.	o.A.

Aus der Tab.1 sieht man, daß die statistischen Daten in der Literatur unvollständig sind. Ein Teil der Bestimmungsmethoden[6,18,19] benötigen aufwendige Extraktionsschritte, da es nicht möglich ist, beide Stoffe gleichzeitig zu extrahieren. Trimethoprim wird am besten aus Carbonatmilieu ph 9[8], Sulfamethoxazol bei einem pH von 3 nach Zugabe von Citratpuffer[9] extrahiert.
Auf eine Extraktion wird bei den Methoden nach Vree[9], Bury[20] und Harzer[23] verzichtet. Während Harzer Vollblut auf die Säule gibt, fällen Bury und Vree erst das Eiweiß aus und spritzen den klaren Überstand auf die Säule. Nur Vree et.al. gelingt es aber, sowohl Trimethoprim als auch Sulfamethoxazol auf einer Säule und mit einem Fließmittel zu trennen und quantitativ zu bestimmen. Die Erfassungsgrenze pro ml Serum liegt allerdings mit 750 ng noch so hoch, daß eine quantitative Bestimmung im Serum nur über einen Zeitraum von wenigen Stunden möglich ist. Die Methode von Bury und Mashford[20] kann 100 ng Trimethoprim/ml Serum nachweisen, doch eine Simultanbestimmung neben Sulfamethoxazol ist hier nicht verwirklicht. Die HPLC-Bestimmung nach Harzer[23] wird hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt, da eine Vollblutaufgabe auf die Säule diese ganz sicher nach wenigen Analysen unbrauchbar macht.

Zusammenfassende Beurteilung

Als Standardmethoden werden bis heute zur Bestimmung des Trimethoprims die Methode nach Schwartz[11] und deren Modifikation nach Kaplan[12] und zur Bestimmung des Sulfamethoxazols die Methode nach Bratton Marshall[22] verwendet. Daneben kommen auch mikrobiologische Methoden zur Anwendung[14]. Alle diese haben den Nachteil, daß sie nicht spezifisch sind und die Standardabweichungen zu groß sind.
Die Spezifität ist bei den HPLC-Bestimmungen[6,9,18,19,20,21,23] gegeben. Diese haben aber den Nachteil, daß sie entweder nicht empfindlich genug sind, oder aber keine Simultanbestimmung der beiden Stoffe Trimethoprim und Sulfamethoxazol zulassen. Mehrere dieser Methoden benötigen zur Probenvorbereitung aufwendige Extraktionsschritte.
Optimal wäre eine simultane HPLC-Bestimmung beider Arzneistoffe, die empfindlich genug ist, die Serenspiegel über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, und die aufwendige Extraktionsschritte erübrigt.

2. Ausarbeitung einer simultanen HPLC-Bestimmung

2.1. Trennung aus wäßriger Lösung

-Festlegen der Meßwellenlänge

Um eine geeignete Meßwellenlänge zu ermitteln, wurden für Trimethoprim und Sulfamethoxazol UV-Spektren aufgenommen. Die Konzentration der Lösungen entsprach der mittleren zu erwartenden Serumkonzentration der beiden Stoffe. So wurde eine 3,44 µmolare (0,1 mg/100 ml) Trimethoprimlösung und eine 39,5 µmolare (1 mg/100 ml) Lösung von Sulfamethoxazol in Methanol vermessen.

Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden errechnet und in Abb.1 wiedergegeben.

In Abb.1 hat Sulfamethoxazol bei 266 nm ein Maximum. Ein wiederholtes Ansteigen der Extinktion ist ab 238 nm zu beobachten. Trimethoprim hat bei 270 nm ein Maximum. Der Wert für die spezifische Extinktion beträgt nach Auterhoff/Kovar[24] 210 bei 270 nm, das entspricht einem molaren Extinktionskoeffizienten von 6097. Ein weiteres Ansteigen der Extinktion ist ab 260 nm zu sehen.

Für eine Simultanbestimmung beider Stoffe bietet sich zunächst die Meßwellenlänge bei 270 nm an.

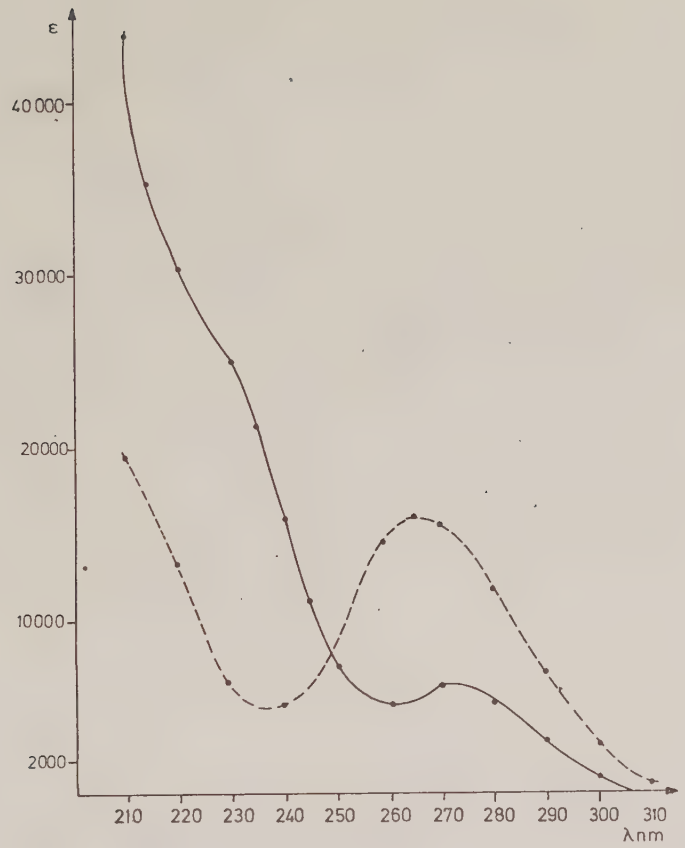


Abb.1 Abhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten von der Wellenlänge.
Trimethoprim (———)
Sulfamethoxazol (-----)

Trägt man aber in einer Graphik statt der errechneten molaren Extinktionskoeffizienten die gemessenen Extinktionswerte der physiologischen Konzentrationen auf -wie in Abb.2-, dann erkennt man, daß für Trimethoprim keine Absorption bei 270 nm zu sehen ist. Eine Detektion des Trimethoprims ist deshalb in diesen geringen Konzentrationen bei 270 nm nicht mehr möglich.
Man muß bei tieferen Wellenlängen etwa zwischen 210 nm und 230 nm messen. Unterhalb 210 nm zu messen ist nicht sinnvoll, da hierbei die meisten Lösungsmittel keine Durchlässigkeit mehr besitzen. Da die Empfindlichkeit bei 210 nm am größten ist, wird im folgenden mit einer Meßwellenlänge von 210 nm detektiert.

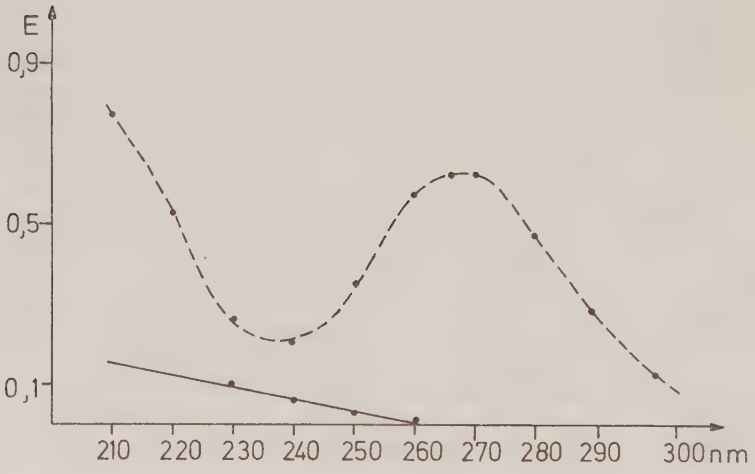


Abb.2 UV-Kurven von Sulfamethoxazol (---) 39,5 µmolar, und Trimethoprim (——) 3,44 µmolar; gemessen in Wasser. Die Konzentrationsverhältnisse geben die der Serumspiegel wieder.

-Fließmittel Methanol-Wasser

Die bisher durchgeführten HPLC-Simultanbestimmungen[9,19,21)] arbeiten alle auf Umkehrphase (RP), weil Trimethoprim als Base und Sulfamethoxazol als Säure mit einem Fließmittel nur auf RP Trägermaterial zu trennen sind.
In der RP-Chromatographie sind Methanol-Wasser Mischungen sehr häufig gebrauchte Fließmittel, da Methanol sehr billig und wenig toxisch ist. Es wurde zu Beginn untersucht, wie sich die Arzneistoffe Trimethoprim und Sulfamethoxazol in ihren k'-Werten bei verschiedenen Methanol-Wassermischungen steigender Methanolkonzentrationen zueinander verhalten. (Abb.3)
Man erreicht mit Methanol-Wasser Gemischen zwar eine deutliche Trennung der beiden Substanzen, doch kann bei einem Vergleich der Kapazitätsverhältnisse gesehen werden, daß die Fließmittelkombinationen in keinem Fall eine ideale Trennung ermöglichen. An eine optimale Trennung werden die Forderungen gestellt, daß die k'-Werte zwischen 1 und 5 liegen. Sind die Werte größer, so geht das auf Kosten der Anaylsenzeit. Es wird deshalb angestrebt, die k'-Werte von Trimethoprim zu verringern.

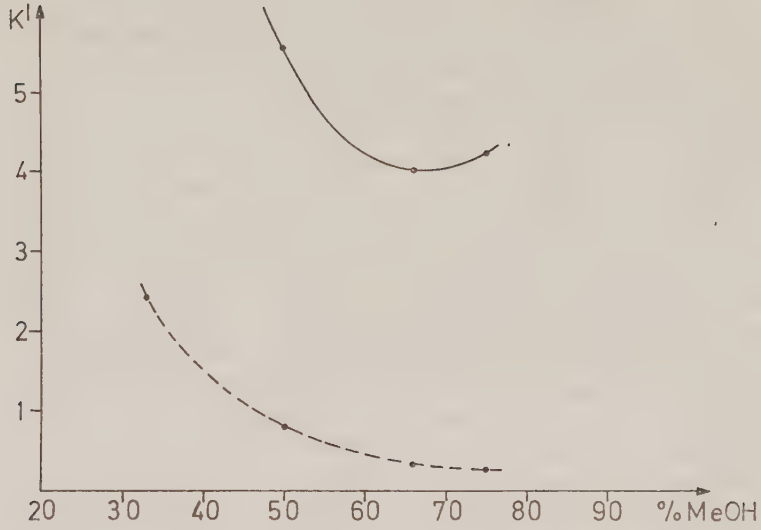


Abb.3 Zusammenhang zwischen dem Methanolgehalt des Fließmittels und den k'-Werten von Sulfamethoxazol(---) und Trimethoprim (——).

-Fließmittel Methanol-Phosphorsäure

In Anlehnung an eine Untersuchung von Ferry[19] wurde anstelle von Wasser Phosphorsäure verschiedener Konzentrationen dem Methanol zugesetzt.

Abb.4 und 5 zeigen den Zusammenhang zwischen den k'-Werten und den verschiedenen Fließmittelkombinationen graphisch.

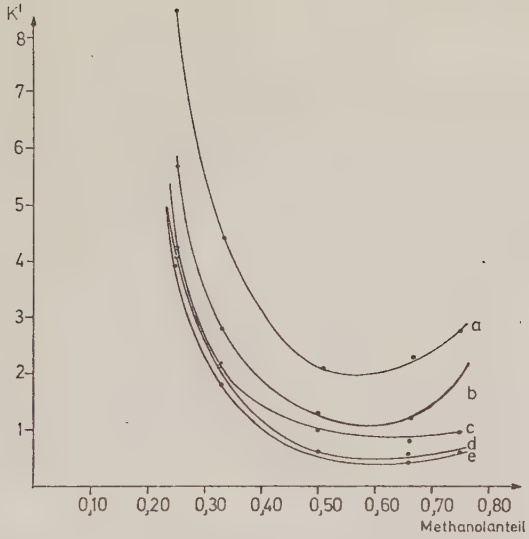


Abb.4 k'-Werte von Trimethoprim in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis Methanol-Phosphorsäurelösung; a: 0,01 M Phosphorsäure; b: 0,05 M Phosphorsäure; c: 0,1 M Phosphorsäure; d: 0,3 M Phosphorsäure; e: 0,5 M Phosphorsäure;

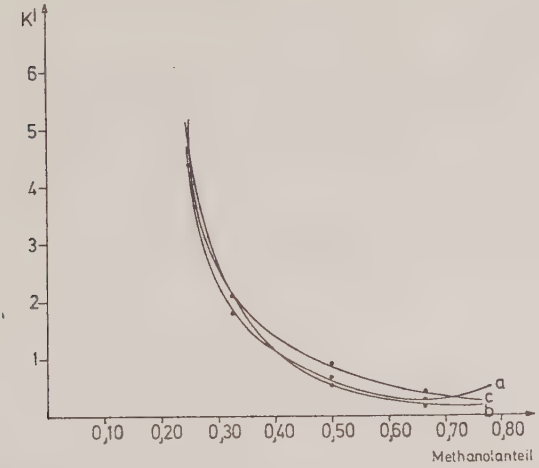


Abb.5 k'-Werte von Sulfamethoxazol in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis Methanol-Phosphorsäurelösung; a: 0,01 M Phosphorsäure; b: 0,05 M Phosphorsäure; c: 0,1 M Phosphorsäure

Die Abb.4 und 5 lassen deutlich erkennen, daß die Säurekonzentration auf die Retentionszeit von Sulfamethoxazol keinen Einfluß hat. Die Konzentration der eingesetzten Phosphorsäure hat aber einen entscheidenden Einfluß auf das Kapazitätsverhältnis (k') -gleichbleibender Methanolgehalt vorausgesetzt- von Trimethoprim. Eine deutliche Verringerung der k'-Werte ist beim Übergang von 0,01 M Phosphorsäure zur 0,05 M Phosphorsäure zu erreichen. Eine weitere Erhöhung führt dazu, daß sich die k'-Werte des Trimethoprims denen des Sulfamethoxazols zu sehr angleichen und der Trennfaktor α zu klein wird. Eine Trennung ist dann erst ab einem Methanolanteil von 0,6 möglich. Der Einsatz von 0,05 M Phosphorsäure erwies sich am günstigsten.

-Optimierung des Methanolgehalts

Der Einfluß des Methanolgehalts auf die Retentionszeiten der Substanzen wurde schon in Abb.3 verdeutlicht. Unter Verwendung von 0,05 M Phosphorsäure ist eine Trennung von Trimethoprim und Sulfamethoxazol im Mischungsverhältnis 0,6 MeOH + 0,4 0,05 M Phosphorsäure in 1 1/2 Minuten möglich. Bei höherem Methanolanteil ($\geq$ 0,60) verlängern sich die Analysenzeiten wieder, weil sich die k'-Werte von Trimethoprim verschlechtern. Abb.6 und die Chromatogramme in Abb.7 verdeutlichen dies.

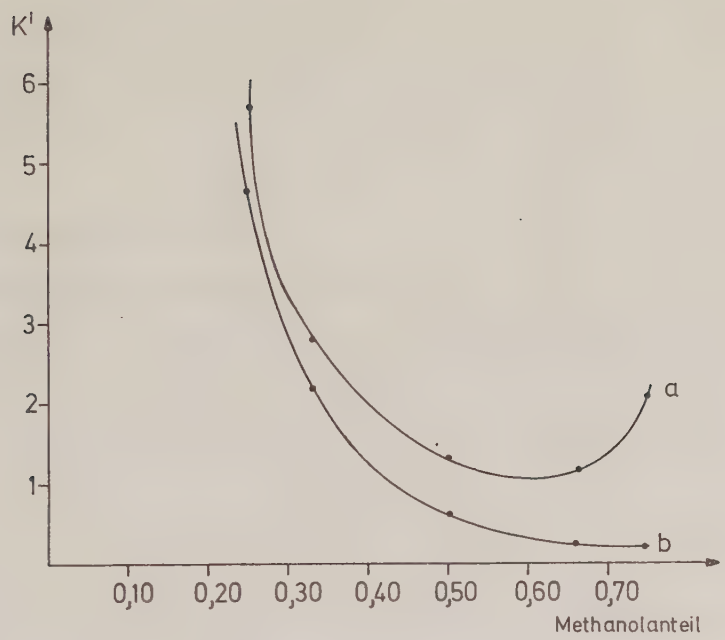


Abb.6 Änderung der k'-Werte von Trimethoprim (a) und Sulfamethoxazol (b) in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis Methanol-Phosphorsäurelösung (0,05 M).

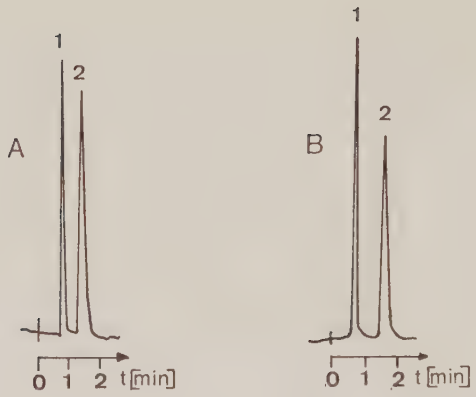


Abb.7 Chromatogramm A FM: 0,05 M Phosphorsäure 0,4 Teile/
Methanol 0,6 Teile
LiChrosorb^{R} RP 8
Säule 250 mm ø 3 mm
Durchflußrate 2,0 ml/min
Peak 1: Sulfamethoxazol
Peak 2: Trimethoprim

Chromatogramm B FM: 0,05 M Phosphorsäure 0,25 Teile/
Methanol 0,75 Teile
LiChrosorb^{R} RP 8
Säule 250 mm ø 3 mm
Durchflußrate 2,0 ml/min
Peak 1: Sulfamethoxazol
Peak 2: Trimethoprim

Das Arbeiten mit einer Fließmittelzusammensetzung 0,4 Teile 0,05 M Phosphorsäure + 0,6 Teile Methanol ermöglicht eine gute Trennung der Arzneistoffe Trimethoprim und Sulfamethoxazol aus wäßrigen Lösungen in kürzester Zeit.

2.2. Trennung im Serum neben N-4-Acetylsulfamethoxazol

Bei den bisherigen Untersuchungen wurden nur reine Lösungen auf die Säule gegeben. Im folgenden wurde nun untersucht, inwieweit sich die für wäßrige Lösungen optimierten Fließmittelgemische auf Seren übertragen lassen.

2.2.1. Probenvorbereitung

-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Sulfamethoxazol ist eine schwache Säure mit einem pK_a-Wert von 6,0[25]. Es ist in der nichtionisierten, lipophilen Form mit vielen, mit Wasser nicht mischbaren, organischen Lösungsmitteln ausschüttelbar. Bye und Brown[18] empfehlen, mit Citratlösung auf pH 3 einzustellen und anschließend mit organischen Lösungsmitteln wie Chloroform oder Ethylacetat die Probelösung zu extrahieren. Der pH sollte aber nicht darunterliegen, weil dann die Gefahr besteht, daß das sekundäre Amin ionisiert und so wieder wasserlöslich wird. Eine zweite Schwierigkeit besteht darin, daß sich bei starkem Schütteln, insbesondere bei der Extraktion mit halogenhaltigen Lösungsmitteln, Emulsionen bilden, die sich nur sehr langsam wieder klären lassen. Die Autoren schlagen deshalb vor, die Extraktion nicht in Scheidetrichtern, sondern besser in Schüttelröhrchen durchzuführen, die anschließend gleich in die Zentrifuge zum Klären der Emulsion gestellt werden können. Im Gegensatz dazu ist Trimethoprim mit einem pK_a-Wert von 7,3[25] bei einem pH 3 nicht zu extrahieren. Bye und Brown[18] bevorzugen hier eine Extraktion bei pH 11. Um Verunreinigungen zu entfernen ist eine Rückextraktion in 0,01 N Schwefelsäure notwendig. Anschließend muß erneut aus einer Natriumcarbonatlösung mit Chloroform bei pH 11 ausgeschüttelt werden. In Gegenwart von Salzsäure kann sich

Diaminopyrimidinhydrochlorid bilden, das in organischen Lösungsmitteln löslich ist, deshalb eignet sich Schwefelsäure besser. In einer Schwefelsäure $>$ 0,01 N geht die Selektivität der Extraktion für Trimethoprim verloren,und bei Verwendung einer Schwefelsäure $<$ 0,01 N wird Trimethoprim nicht mehr quantitativ rückextrahiert.
Die Vorteile einer Extraktion der Arzneistoffe aus dem Serum sind darin zu sehen, daß selektiv ausgeschüttelt und die Substanzen durch Einengen der organischen Phase angereichert werden können. Dies ist vor allem bei sehr geringen Blutspiegelkonzentrationen wichtig. Neben den oben genannten Schwierigkeiten bei den Ausschüttelungen ist weiterhin ein sehr gravierender Nachteil, daß die Substanzen nicht in einem Gang ausgeschüttelt werden können, sondern daß dafür zwei getrennte Arbeitsgänge notwendig sind. Das bedingt besonders bei Reihenuntersuchungen einen großen Arbeitsaufwand. Dazu kommt, daß mit jedem weiteren Schritt bei der Probenvorbereitung sich zusätzliche Fehlerquellen einschleichen können.
Aus all diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nach Möglichkeiten gesucht,eine Extraktion zu umgehen.

-Direktaufgabe der Seren nach vorheriger Enteiweißung

Bei der Aufgabe von unbehandeltem Serum auf die Säulen werden diese binnen kürzester Zeit zerstört. Der Druckwiderstand der Säulen nimmt schon nach wenigen Probenaufgaben zu, gleichzeitig verringert sich auch die Bodenzahl. Dies kommt daher, weil durch das Methanol in der Fließmittelkombination die Proteine auf der Säule gefällt werden und diese verstopfen. Genau dies muß auch eintreten, wenn man -wie K.Harzer[23)] vorschlägt- die Säule nach fünf bis zehn Analysen mit Methanol nachspült.
Erschwerend kommt noch dazu, daß bei den geringen Blutspiegelkonzentrationen von Trimethoprim und Sulfamethoxazol

eine Auftragemenge von 10/ul zu einer quantitativen Erfassung nicht mehr ausreicht. Deshalb muß mit einer 100/ul Schleife der Firma Rheodyne^{R} gearbeitet werden. Werden aber auf eine analytische Säule 100/ul rohes Serum aufgegeben, so führt dies zu einer Veränderung der Trennleistung und einer raschen Erschöpfung der Säule.
Eine Enteiweißung der Proben muß vor dem Aufbringen auf die Säule dringend durchgeführt werden.

Möglichkeiten der Enteiweißung[26)]

Löslichkeit und Aussalzen

Versetzt man Serum mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung, so fallen die Proteine aus. Allerdings muß bei dieser Methode das Serum stark verdünnt werden, und deshalb fällt sie weg.

Dialyse

Proteine können als Makromoleküle nicht durch Cellophanmembranen diffundieren, wohl aber kleinere Moleküle und Ionen. Deshalb wurden mit Dialyseschläuchen der Firma Berghof in Tübingen, Enteiweißungsversuche unternommen. Mit Hilfe einer selbst gebauten Spritzenkombination an beiden Seiten der Dialyseschläuche, von denen solche mit verschieden großen Porendurchmessern getestet wurden, gelang es nur unter größter Kraftanstrengung, einige Tropfen enteiweißtes Serum zu erhalten. Meist platzte der Schlauch. Darüberhinaus besteht die Gefahr, daß bei dieser Art der Deproteinisierung die an Eiweißstoffe gebundenen Arzneistoffe ebenfalls zurückgehalten werden.

Essigsäure Kochprobe

Proteine werden durch Erhitzen denaturiert. Wird anschließend mit einer schwachen Säure angesäuert, so kommt es beim isoelektrischen Punkt zur Ausfällung der schwerlöslichen denaturierten Proteine. Diese Methode wurde mit

gutem Erfolg erprobt, sie erfordert allerdings einen Arbeitsschritt mehr als die folgende Methode.

Schwerlösliche Anlagerungsverbindungen

Einige große Anionen geben bei saurer Reaktion mit Proteinen schwerlösliche Anlagerungsverbindungen. Zu diesen Fällungsreagenzien gehören Trichloressigsäure und Perchlorsäure. Nach Moll[27] sollte die Endkonzentration an Trichloressigsäure 0,25-0,5 molar bzw. 0,25-0,1 molar an Perchlorsäure sein.

Enteiweißung mit Perchlorsäure

Für UV-Bestimmungen wird Perchlorsäure empfohlen, da es selbst kaum absorbiert und so im Chromatogramm nicht berücksichtigt werden muß. Als Endkonzentration wird eine 0,25-0,1 molare Lösung angestrebt.

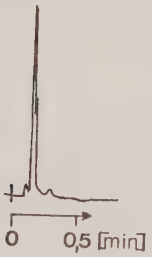


Abb.8 Peak der Perchlorsäure in 20 facher Überdosierung
Fließmittel: Methanol 0,6 Teile/
Phosphorsäure 0,4 Teile
LiChrosorb^{R} RP 8 10 µm
Durchfluß 2 ml/min

Der Vorteil dieser zuletzt genannten Methode liegt darin, daß die Serumproben bei der Enteiweißung nicht zu stark

verdünnt werden müssen und dadurch die Nachweisgrenzen für Trimethoprim und Sulfamethoxazol gesenkt werden können.

Abb.9 Chromatogramm von Testserum Wellcomtrol^{R}One, das mit Perchlorsäure enteiweißt wurde.
LiChrosorb^{R} RP 8 10/um
Säule 250 mm ø 3 mm
FM: Methanol 0,6 Teile/
0,05 M Phosphorsäure 0,4 Teile
Durchflußrate 2,0 ml/min
Schreibervorschub 1 Inch/min

In der folgenden Abb.10 wurden dem Kontrollserum vor der Proteinfällung mit Perchlorsäure je 50/ug Trimethoprim und 50/ug Sulfamethoxazol zugesetzt.
Die Chromatographiebedingungen der Abb.9 wurden beibehalten.

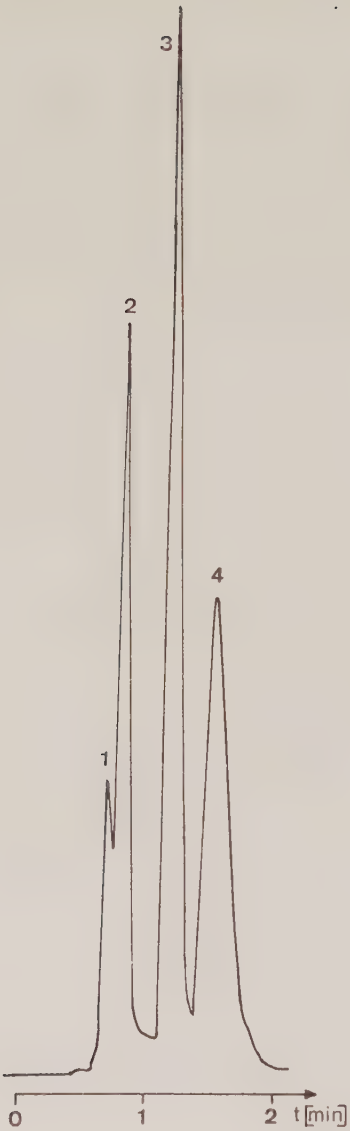


Abb.10 Trennung der Serum-inhaltsstoffe von den Substanzen Trimethoprim und Sulfamethoxazol.

LiChrosorb^{R} RP 8 10 /um
Säule 250 mm lang Ø 3 mm
FM: Methanol 0,6 Teile/0,05 M Phosphorsäure 0,4 Teile
Durchflußrate 2,0 ml/min
Schreibervorschub 1 Inch/min

Peak 1: Serum
Peak 2: Sulfamethoxazol
Peak 3: Serum
Peak 4: Trimethoprim

Bei den gewählten chromatographischen Bedingungen ist eine vollständige Trennung von Trimethoprim, Sulfamethoxazol und den Serumbestandteilen nicht verwirklicht.

Soll das Serum nach der Proteinfällung direkt eingespritzt werden, muß ein anderes Trennsystem gesucht werden.

2.2.2. Optimierung des Fließmittels

-Methanol-Phosphatpuffer

Mit der bisherigen Fließmittelkombination Methanol/0,o5 M Phosphorsäure ist es nicht möglich, die Arzneistoffe Sulfamethoxazol und Trimethoprim vom Serum quantitativ abzutrennen.
Vree[9] et al. gelang eine solche Trennung durch Arbeiten mit Phosphatpuffer pH 6,7 und Ethanol (400 + 80) als Elutionsmittel. Beim Nacharbeiten wurde aber festgestellt, daß bei diesem pH die Retentionszeiten für Trimethoprim zu lang werden.
Statt dessen wählten wir als Fließmittelbasis Phosphatpuffer pH 5,3 dem Methanol steigender Konzentrationen zugesetzt wurde . Die untersuchten Methanolanteile waren 0,20, 0,30 und 0,40.
Bei allen drei der untersuchten Fließmittelkombinationen gelang eine Trennung der Arzneistoffe von den Serumbestandteilen. Die k'-Werte sind bei einem Methanolanteil von 0,2 aber noch so groß, daß eine Analyse über 13 Minuten dauert. Beim Arbeiten mit Methanolanteilen von 0,3 bzw. 0,4 verkürzen sich die Analysenzeiten auf 5,5 bzw. 3 Minuten. Ein Vergleich mehrerer Säulen miteinander zeigte, daß mit einem Methanolanteil von 0,4 eine Grundlinientrennung Sulfamethoxazol/Trimethoprim nicht immer zu erreichen ist. Wird mit einem Mischungsverhältnis 0,35 Teile Methanol + 0,65 Teile Phosphatpuffer pH 5,3 gearbeitet, kann Sulfamethoxazol und Trimethoprim immer getrennt werden.

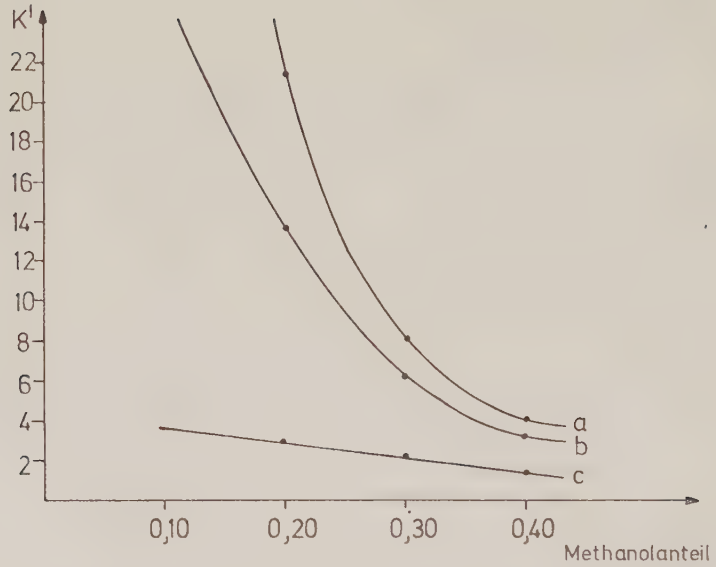


Abb.11 Änderung der k'-Werte von Trimethoprim (a), Sulfamethoxazol (b) und von dem letzten Serumpeak (c) in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis Methanol/Phosphatpuffer pH 5,3

Die Abb. verdeutlicht, daß geringere Methanolanteile als 0,30 wegen der langen Analysenzeiten und der dadurch bedingten großen Fließmittelmengen nicht sinnvoll sind.

Ein Hauptmetabolit von Sulfamethoxazol ist N-4-Acetyl-sulfamethoxazol. Dieser Metabolit ist zwar hauptsächlich im Urin zu finden, doch ist auch im Serum mit einigen Prozenten zu rechnen. Deshalb ist es notwendig, diesen Metaboliten von den beiden anderen Substanzen abzutrennen.

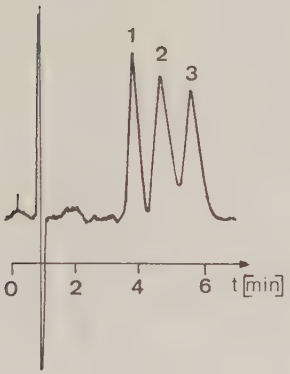


Abb.12 HPLC-Chromatogramm von Sulfamethoxazol, Trimethoprim und N-4-Acetylsulfamethoxazol aus wäßriger Lösung.

FM: Phosphatpuffer pH 5,3 0,7 Teile/
Methanol 0,3 Teile
Säule 250 mm lang ø 3 mm
LiChrosorb^{R} RP 8 10 µm
Durchfluß 2 ml/min
Druck 140 bar

Peak 1: Sulfamethoxazol
Peak 2: Trimethoprim
Peak 3: N-4-Acetylsulfamethoxazol

Aus Abb.12 geht hervor, daß Trimethoprim und Acetylsulfa-methoxazol nicht ganz getrennt sind. Diese Auflösung ist auch auf einer Säule mit einer höheren Bodenzahl nur schwer zu erreichen. Dies liegt daran, daß der Trimethoprimpeak ein "Backtailing" zeigt, das nicht säulenbedingt ist. Durch eine Variation des Fließmittel-pH wurde versucht, eine deutlichere Trennung zu erreichen.

-Variation des pH Wertes

Es wurde bei gleichbleibendem Methanolanteil von 0,3 der Phosphatpuffer im Bereich pH 4,9 bis pH 5,3 verändert und die k'-Werte der Substanzen miteinander verglichen. Der Methanolanteil von 0,3 wurde deshalb genommen, weil bei diesem Methanolanteil die Arzneistoffe von den Seruminhaltsstoffen sicher abgetrennt sind.

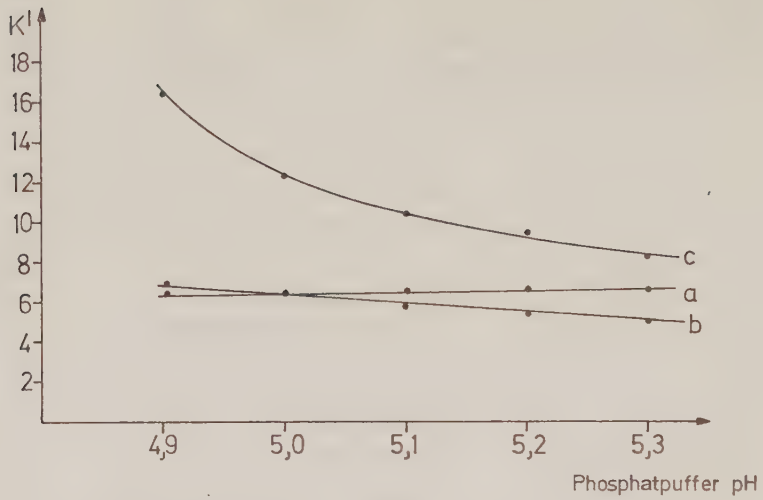


Abb.13 Abhängigkeit der k'-Werte von Trimethoprim (a), Sulfamethoxazol (b) und N-4-Acetylsulfamethoxazol(c) vom pH der Fließmittelzusammensetzung. Methanolanteil 0,3.

Aus den Ergebnissen dieser Chromatogramme lassen sich folgende Schlüsse ziehen:
Über einen Bereich von pH 4,9 bis pH 5,3 bleiben die k'-Werte von Trimethoprim nahezu unverändert, während sich die k'-Werte von Sulfamethoxazol mit steigendem pH Wert des Fließmittelgemisches geringfügig verringern. Bei einem pH von 4,9 sind die k'-Werte von Trimethoprim kleiner als die von Sulfamethoxazol, bei pH 5 sind sie gleich und werden dann von Stufe zu Stufe größer. Es tritt hier eine Umkehrung im Retentionsverhalten ein.
N-4-Acetylsulfamethoxazol wird erst ab einem pH 5,2 bei einem k'-Wert unter 10 eluiert. Eine Trennung der drei

Substanzen ist durch eine Variation des pH allein nicht zu verwirklichen.

-Variation des Methanolgehalts

Verringert man bei gleichbleibendem pH den Methanolanteil auf 0,25, so gelingt die Trennung aller drei Substanzen. N-4-Acetylsulfamethoxazol wird bei Methanolgehaltsveränderungen zu kleineren Prozenten stärker retardiert als Trimethoprim.

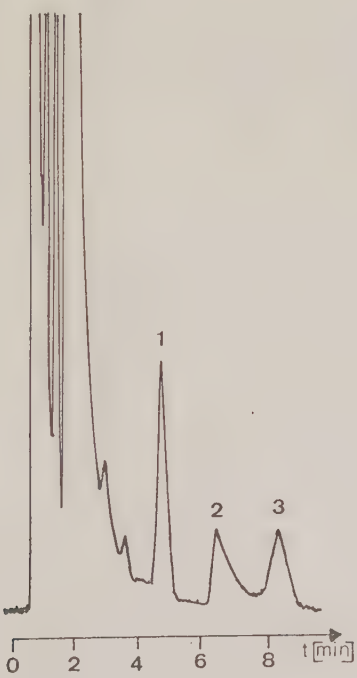


Abb.14 HPLC-Chromatogramm von Sulfamethoxazol, Trimethoprim und N-4-Acetylsulfamethoxazol in Humanserum.
FM: Phosphatpuffer pH 5,2
0,75 Teile/ Methanol 0,25 Teile
LiChrosorb RP 8 10 µm
Säule 250 mm ø 3 mm
Durchfluß 2 ml/min

Peak 1: Sulfamethoxazol
Peak 2: Trimethoprim
Peak 3: N-4-Acetylsulfamethoxazol

Die Substanzen wurden dem Humanserum zugesetzt, das anschließend mit Perchlorsäure enteiweißt wurde. Die vielen Peaks zu Beginn des Chromatogramms sind von den Serum-inhaltsstoffen

Im Chromatogramm Abb.14 sind die Serumstoffe von den Arzneistoffen abgetrennt. Man erkennt aber auch, daß die Peaks von Trimethoprim und N-4-Acetylsulfamethoxazol sehr breit werden. Durch diese auseinandergezogenen Peaks werden die Nachweisgrenzen für eine quantitative Bestimmung herabgesetzt. Weiterhin nachteilig an diesem Fließmittelsystem ist, daß Trimethoprim mit einem so starken "Tailing" eluiert wird. Auch dies trägt zur Peakverbreiterung bei. Die zu bestimmenden Serumwerte liegen für Trimethoprim zwischen 1-2 µg/ml. Diese Werte können mit dem vorliegenden Fließmittelsystem nicht mehr quantitativ erfaßt werden. Es muß deshalb nach einem System gesucht werden, das eine Trennung ermöglicht und gleichzeitig die k'-Werte von Trimethoprim verringert.

-Ethanol-Phosphatpuffer

In Abb.13 konnte gezeigt werden, daß durch eine Erniedrigung des pH auf 4,9 eine Umkehrung der k'-Werte von Trimethoprim und Sulfamethoxazol möglich ist. Dies gelingt mit dem Phosphatpuffersystem nicht bis zur Basislinientrennung, da kleinere pH Werte als 4,9 damit nicht zu erreichen sind. Citratpuffer kann nicht zur Anwendung gelangen, da dieser im UV Bereich bei 230 nm keine Durchlässigkeit mehr hat. Eine Erniedrigung des pH ist auch deswegen nicht günstig, da sich dadurch nur die Retentionszeiten von Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol verlängern, die Retentionszeit für Trimethoprim nicht kürzer wird. Bei den Arbeiten von Vree[9] und von Helboe und Thomsen[21] fällt auf, daß Trimethoprim vor Sulfamethoxazol eluiert wird. Helboe und Thomsen arbeiten mit Acetonitril als Fließmittelkomponente, dessen Polarität 11,8 beträgt. Im Gegensatz dazu ist Methanol polarer. Die Polarität von Methanol wird mit 12,9 angegeben. Vree et al. haben Ethanol als Fließmittelkomponente. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß durch eine Erhöhung der Lipophilität des Fließmittels eine Umkehrung

der Retentionszeiten zu erreichen ist.
Aus diesem Grunde wurde im folgenden Ethanol dem Fließmittel zugemischt. Ethanol wurde deshalb gewählt, weil er billig zu haben, leicht durch Destillation bei 78°C zu reinigen und darüberhinaus bis in einen sehr tiefen UV-Bereich hinein noch durchlässig ist.

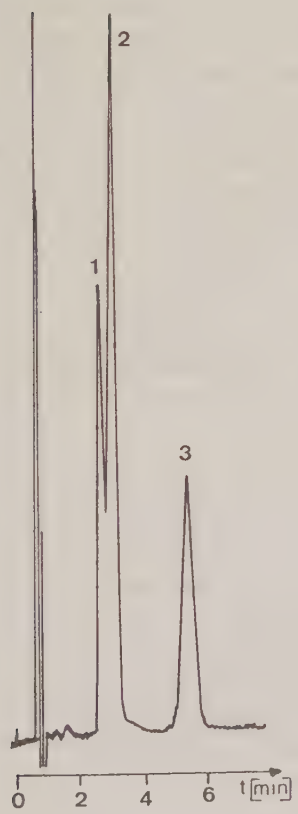


Abb.15 HPLC-Chromatogramm von Trimethoprim, Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol in wäßriger Lösung.

FM: Phosphatpuffer pH 5,0 0,75 Teile/
Methanol 0,2 Teile/
Ethanol 0,05 Teile
LiChrosorb^{R} RP 8 10 µm
Säule 250 mm ø 3 mm
Durchfluß 2 ml/min

Peak 1: Trimethoprim
Peak 2: Sulfamethoxazol
Peak 3: N-4-Acetylsulfamethoxazol

Unter diesen Analysenbedingungen ist eine Basislinientrennung zwischen Trimethoprim und Sulfamethoxazol noch nicht zu erreichen. Die Retention für Trimethoprim ist nun schon deutlich kürzer als für Sulfamethoxazol.

Wird der Ethanolanteil auf 0,8 erhöht, sind Trimethoprim und Sulfamethoxazol getrennt, die Seruminhaltsstoffe haben aber die gleichen k'-Werte.

Aufgrund der Tatsache, daß bei gleichbleibendem pH des Fließmittels und abnehmender Polarität Trimethoprim vor Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol eluiert wird, wurde statt des Fließmittelgemisches mit den drei Komponenten Phosphatpuffer-Methanol-Ethanol ein Zweikomponentengemisch Phosphatpuffer-Ethanol getestet. Vree[9] et al. erreichten mit Ethanol eine gute Trennung.

Abb.16 HPLC-Chromatogramm von Trimethoprim, Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol in wäßriger Lösung.

FM: Phosphatpuffer pH 5,0 5 Teile/
Ethanol 99% 1 Teil
LiChrosorb^{R} RP 8 10 µm
Säule 250 mm ø 3 mm
Durchfluß 2 ml/min

Peak 1: Trimethoprim
Peak 2: Sulfamethoxazol
Peak 3: N-4-Acetylsulfamethoxazol

Mit dieser Fließmittelkombination wird eine gute Trennung der Substanzen untereinander erreicht. Allerdings sind die Serumstoffe noch nicht von den Arzneistoffen abgetrennt. Es muß die Ethanolkonzentration ermittelt werden, die eine Trennung der interessierenden Substanzen von den Serumbestandteilen ermöglicht.

Im folgenden wurde bei gleichbleibendem pH und veränderlichen Ethanolkonzentrationen gearbeitet. Die k'-Werte der Stoffe Trimethoprim, Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol wurden mit den k'-Werten des Serumpeaks verglichen.

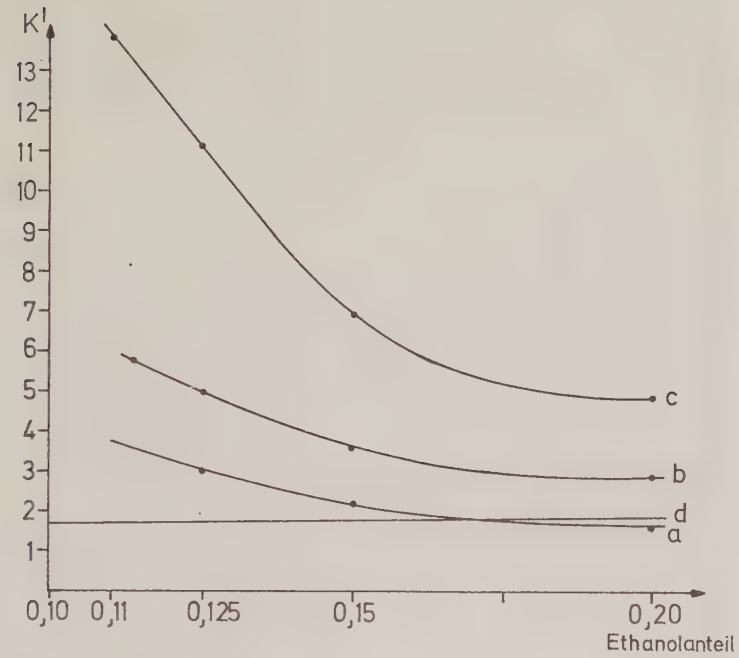


Abb.17 k'-Werte von Trimethoprim(a), Sulfamethoxazol (b), N-4-Acetylsulfamethoxazol (c) und dem Serumpeak (d) in Abhängigkeit vom Ethanolanteil bei einem Phosphatpuffer pH 5,0.

Die Graphik verdeutlicht, daß erst ab einem Mischungsverhältnis Ethanol-Phosphatpuffer (75+500) eine Trennung von den Seruminhaltsstoffen möglich ist. Unter diesen Trennbedingungen dauert eine Analyse 11 Minuten.

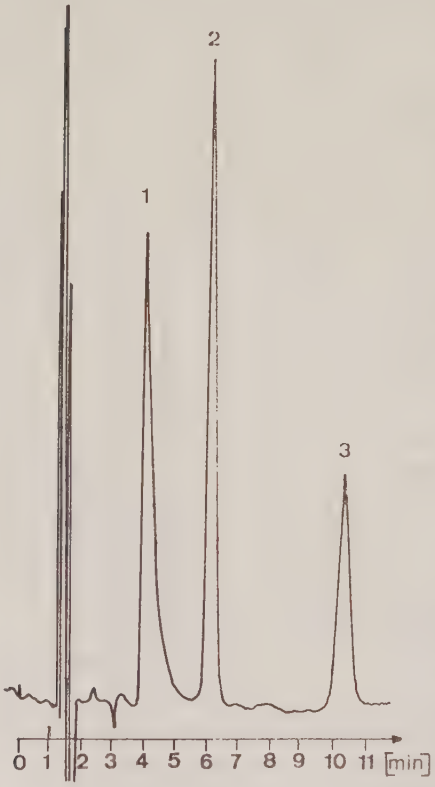


Abb.18 HPLC-Chromatogramm von Trimethoprim, Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol in wäßriger Lösung.

FM: Phosphatpuffer pH 5,0
5 Teile/
Ethanol 99% 0,75 Teile
LiChrosorb^{R} RP 8 7 µm
Säule 250 mm lang ø 3 mm
Durchfluß 1,1 ml/min

Peak 1: Trimethoprim
Peak 2: Sulfamethoxazol
Peak 3: N-4-Acetylsulfamethoxazol

Das Chromatogramm in Abb.18 resultiert aus Abb.17. Wird anstelle des 10 µm Materials 7 µm Material als stationäre Phase verwendet, dann wird die Trennung verbessert.

Eine Verbesserung der Trennung ist durch den Einsatz von Säulenmaterial mit 7 µm mittlerer Korngröße zu erreichen.

Die Peaks werden schmäler und dadurch höher. Dies hat den Vorteil, daß die Nachweisgrenze weiter erhöht werden kann. Gleichzeitig erhöht sich aber der Gegendruck der Säule, so daß die Durchflußrate herabgesetzt werden muß. Die Volumengeschwindigkeit ist dem Druckabfall längs der Säule proportional. Den Zusammenhang gibt die Permeabilität $K_F(cm^2)$ wieder. Je größer die Permeabilität einer Säule ist, desto geringer ist der Druckabfall. Dieser Zusammenhang zwischen der Permeabilität und der Teilchengröße kann für die chromatographische Praxis nach folgender Faustregel in guter Näherung errechnet werden[28].

Es gilt: $$K_F = \frac{d_p^2}{1000}$$

wobei d_p den Teilchendurchmesser des Adsorbens in /um angibt. Dies bedeutet, daß bei Verwendung von 7 /um Material der notwendige Druck zur Erzeugung des gleichen Durchflusses um das Doppelte erhöht werden muß. Da die Pumpen des verwendeten HPLC Gerätes nur einen Gegendruck von 250 bar zulassen, kann lediglich mit einem Durchfluß von 1,1 ml/min gearbeitet werden. Dies entspricht einem Gegendruck von 210 bar. Eine Beschleunigung der Analyse durch eine Erhöhung des Durchflusses auf 1,2 ml/min führt zu einem Gegendruck von 238 bar. Bei einem so hohen Druck darf nicht über einen längeren Zeitraum gearbeitet werden.

In Abb.18 zeigt Trimethoprim ein "tailing". Das hat zur Folge, daß eine Trennung Trimethoprim-Sulfamethoxazol schwieriger wird, da Trimethoprim im Chromatogramm mehr Platz braucht und Sulfamethoxazol zu größeren k'-Werten hin verschoben werden muß. Im vorstehenden Chromatogramm ist der Trennfaktor α für Trimethoprim-Sulfamethoxazol 1,75. Sie sind basisliniengetrennt. Im allgemeinen gilt, daß schon bei einem α-Wert über 1,1 eine gute Trennung erzielt werden kann[28]. Dies ist bei den vorgeschlagenen

Trennbedingungen nicht der Fall.
Der Symmetriefaktor nach Ph.Eur.[29] ist definiert als

$$S = \frac{y_x}{2A}$$

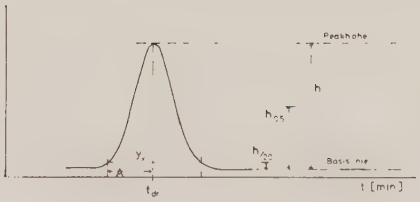


Abb.19 Symmetriefaktor nach Ph.Eur.

Im allgemeinen wird der Symmetriefaktor zur Charakterisierung der Güte einer Säule herangezogen. Bei vorstehender Trennung ist dieses "Tailing" nur bei Trimethoprim zu beobachten. Dieses "Tailing" wird durch den pH des Fließmittels verursacht. Es wurde im folgenden der pH des Fließmittels verändert und der Symmetriefaktor des Trimethoprims überprüft.

Tab.2 Zusammenhang zwischen pH des Fließmittels, Symmetriefaktor des Trimethoprims und k'-Wert des Trimethoprims, Sulfamethoxazols und des N-4-Acetylsulfamethoxazols.

pH	Symmetrie faktor S	k' TMP	k' SMZ	k' Ac-SMZ
5,0	3,7	6,5	--	--
5,5	2,8	7,55	--	--
6,0	2,5	9,8	--	--
6,5	2,4	14,5	1,89	3,34
7,0	1,6	20,32	1,50	2,68
7,5	1,5	34,5	1,1	1,89

Es zeigte sich, daß beim Arbeiten im pH-Bereich von 7-7,5 der Symmetriefaktor für Trimethoprim in den Bereich um 1,5 gelangt, in dem ein optimales Arbeiten erst möglich ist. Allerdings verschlechtern sich die k'-Werte für Trimethoprim so stark, daß ein Arbeiten in diesem pH-Bereich nicht mehr zu vertreten ist. Das liegt daran, daß Trimethoprim im schwach alkalischen Milieu in nichtionisierter Form vorliegt, lipophiler Natur ist und so länger an dem unpolaren Säulenmaterial festgehalten wird. Vergleicht man dagegen die k'-Werte von Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol bei pH 6,5-7,5, so sieht man, daß diese immer kleiner werden. Damit werden frühere Beobachtungen bestätigt, daß mit steigendem pH des Fließmittels die Retentionszeiten für Trimethoprim länger, die für Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol kürzer werden. Will man aber symmetrische Trimethoprimpeaks erhalten, so geht das auf Kosten der Analysenzeit und der Trennung. Im pH-Bereich von 6,5-7 fällt der Sulfamethoxazolpeak mit den Serumpeaks zusammen und der Trimethoprim-Peak wird unnötig lang retardiert. Die kurzen Retentionszeiten der Sulfonamide sind damit zu erklären, daß sie in die-

sem pH-Milieu deprotoniert werden, ionisiert vorliegen und von der unpolaren Säule nicht adsorbiert werden. Will man nun Trimethoprim und Sulfamethoxazol von den Serumbestandteilen in möglichst kurzer Zeit abtrennen, so muß ein "Tailing" des Trimethoprims in Kauf genommen werden.

-Acetonitril-Phosphatpuffer

Der Nachteil der Trennung mit einem methanolhaltigen Fließmittel liegt in der relativ späten Elution des Trimethoprims, bei Anwendung von Ethanol als Fließmittel an dem großen Druckabfall in der Säule. Dieser führt zu einer außergewöhnlich großen Belastung von Säulenmaterial und Pumpen. Helboe und Thomsen[21)] gelang mit Acetonitril als Fließmittelbestandteil in Verbindung mit Phosphorsäure eine gute Trennung der isolierten Substanzen. Da Acetonitril eine geringere Viskosität als Ethanol besitzt, der Druckabfall einer Säule aber unmittelbar mit der Viskosität eines Fließmittels zusammenhängt, wurde noch Acetonitril in Verbindung mit Phosphatpuffer als Fließmittel erprobt.
Grundlage war bei den folgenden Untersuchungen Phosphatpuffer pH 5,3, dem Acetonitril steigender Konzentration zugesetzt wurde.

Tab.3 Abhängigkeit der k'-Werte Trimethoprims, Sulfamethoxazols und N-4-Acetylsulfamethoxazols vom Acetonitrilgehalt bei konstantem pH des Phosphatpuffers 5,3.

Acetonitrilanteil	k' TMP	k' SMZ	k' Ac-SMZ
0,166	2,61	5,82	4,42
0,2	1,92	4,56	3,31
0,23	1,36	3,31	2,26

Bei pH 5,3 des Fließmittels ist eine gute Trennung der Stoffe vom Serum nur bei einem Acetonitrilgehalt von 0,166 möglich. Es ist festzustellen, daß eine Umkehrung der Retentionszeiten zwischen Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol stattgefunden hat. Da die k'-Werte von Sulfamethoxazol noch relativ hoch liegen, wurde der pH des Phosphatpuffers auf 5,5 angehoben.

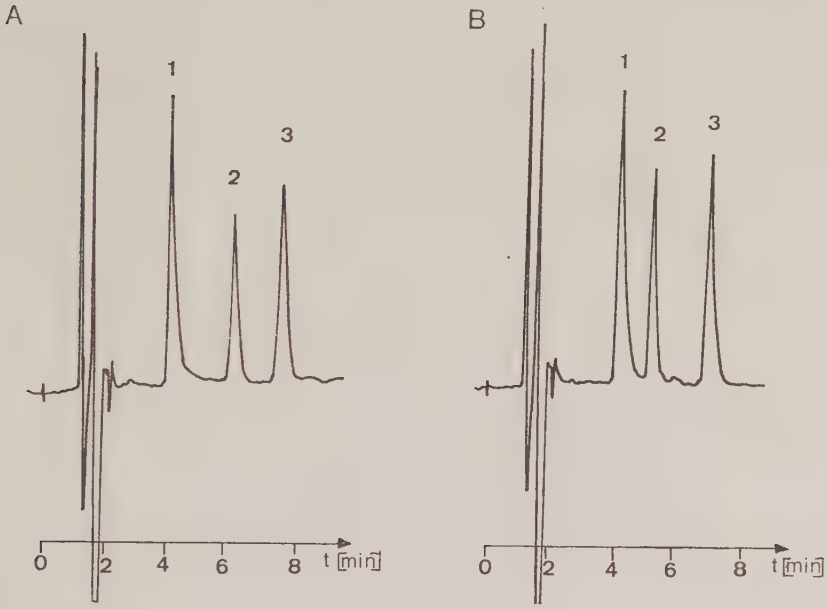


Abb.20 Chromatogramm A FM: Phosphatpuffer 5,3 5 Teile/
Acetonitril 1 Teil
LiChrosorb^{R} RP 8 7 µm
Säule 250 mm lang ⌀ 3 mm
Durchfluß 1,1 ml/min

Chromatogramm B FM: Phosphatpuffer 5,5 5 Teile/
Acetonitril 1 Teil

Peak 1: Trimethoprim
Peak 2: N-4-Acetylsulfamethoxazol
Peak 3: Sulfamethoxazol

Deutlich ist das Zusammenrücken der Arzneistoffe Trimethoprim (1), N-4-Acetylsulfamethoxazol (2) und Sulfamethoxazol (3) zu erkennen. Das Arbeiten bei diesem erhöhten pH 5,5 verkürzt die Analysenzeit nicht nur um ca. 10%, sondern erlaubt auch eine deutlichere Abtrennung von den Serumbestandteilen durch einen etwas höheren k'-Wert des Trimethoprims. Da in Abb. 20 B Trimethoprim und N-4-Acetylsulfamethoxazol nicht ganz grundliniengetrennt sind, wurde der pH des Phosphatpuffers auf 5,4 eingestellt.

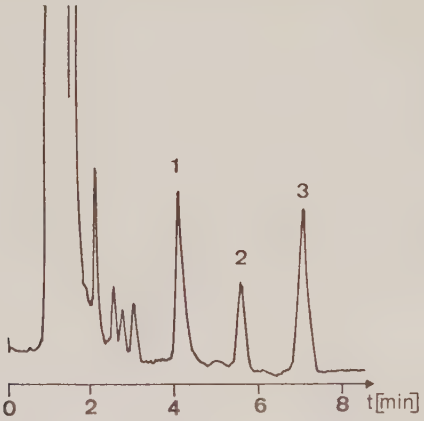


Abb.21 FM: Phosphatpuffer 5,4 5 Teile/
Acetonitril 1 Teil
LiChrosorb^{R} RP 8 7 µm
Säule 250 mm lang, ø 3 mm
Durchfluß 1,2 ml/min
Peak 1: Trimethoprim
Peak 2: N-4-Acetylsulfamethoxazol
Peak 3: Sulfamethoxazol

Die Arzneistoffe wurden einem Humanserum zugesetzt, das mit Perchlorsäure enteiweißt wurde.

Der Vorteil in der Verwendung von Acetonitril als Fließmittelkomponente gegenüber Ethanol liegt darin, daß N-4-Acetylsulfamethoxazol kleinere k'-Werte hat, und der Druckabfall an der Säule sehr stark gesenkt werden kann. Dadruch kann der Durchfluß/min erhöht und die Analysendauer auf < 8 Minuten gesenkt werden.

2.2.3. Festlegung der Meßwellenlänge

-Erstellung von Eichgeraden bei UV-Detektion mit 210, 220 und 230 nm Meßwellenlänge

Für eine quantitative Auswertung der Peaks eines Chromatgramms bieten sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten an, die bei Verwendung eines linearen Detektors über einen grösseren Konzentrationsbereich Proportionalität gewährleisten. Dies sind die Auswertung der Peakflächen und der Peakhöhen. Für eine quantitative Auswertung der Peakflächen gilt, daß die Peakform bei einer Integratorauswertung keinen Einfluß auf die Richtigkeit der Ergebnisse hat. Der zur Verfügung stehende Integrator konnte bei der Verstärkung, die bei der Detektion von Trimethoprim verwendet wird, nicht eingesetzt werden, da das Rauschen der Basislinie zu stark war. Die Handauswertung der Chromatogramme nach der Formel der Peakhöhe mal Breite des Peaks auf halber Höhe ist für den Sulfamethoxazolpeak möglich, nicht aber für den Trimethoprimpeak, da dieser nicht symmetrisch ist. Folgende Eichgeraden wurden durch Messen der Peakhöhen ermittelt.
Die Höhe eines Peaks ist in einem Chromatogramm stark von der Retentionszeit abhängig. Wegen dieser Abhängigkeit dürfen keine starken Schwankungen der Retention auftreten. Im Gegensatz zur Flächenauswertung spielen aber Flußschwankungen bei der Höhenmeßmethode keine Rolle.

- Eichgeraden für Trimethoprim

Über eine Rheodyne Schleife mit 100 µl wurden wäßrige Lösungen von Trimethoprim auf die Säule gegeben.
Die Höhe der Peaks, gemessen bei 210, 220 und 230 nm, wurden in einer Tabelle zusammengefaßt und danach die Eichgeraden errechnet.
Die Eichgeraden wurden nach der Formel für die lineare Regression y = a+bx berechnet

$$a = \left[\frac{\sum y_i}{n} - b \frac{\sum x_i}{n} \right]$$

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

Darüberhinaus wurde noch das Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet. Das Bestimmtheitsmaß liefert eine Angabe über die "Qualität" der Anpassung der vorgegebenen Daten. Liegt der errechnete Wert für r^2 nahe bei 1,000, so spricht dies für eine gute Anpassung. Ist der Wert dagegen nur wenig von Null verschieden, so ist die Anpassung sinnlos und man sollte eine andere Regressionsfunktion wählen.

$$r^2 = \frac{\left[\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n} \right]^2}{\left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right] \left[\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} \right]}$$

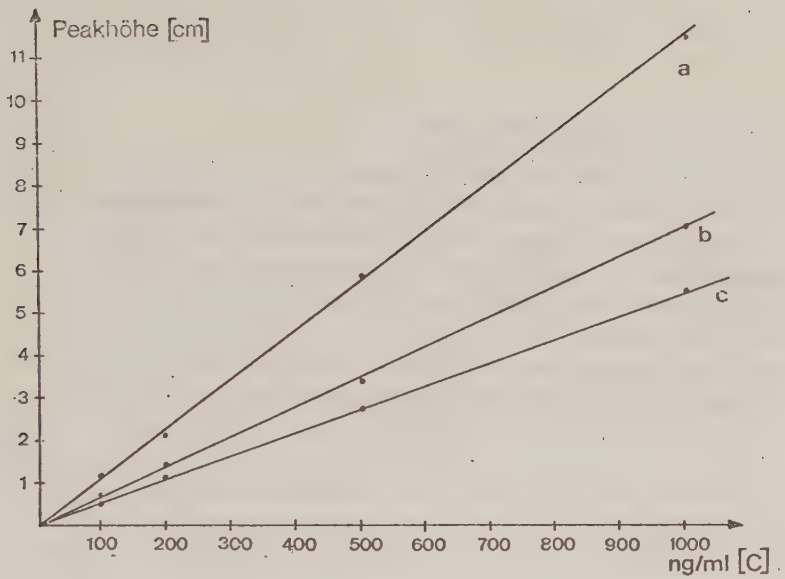


Abb.22 Eichgeraden für Trimethoprim gemessen bei 210 (a), 220 (b) und 230 nm (c).

Die Errechnung der Eichgeraden ergab folgende Werte:

210 nm $y = -0{,}0860 + 0{,}0117\ x$ $r^2 = 0{,}9990$

220 nm $y = -0{,}0561 + 0{,}0071\ x$ $r^2 = 0{,}9984$

230 nm $y = 0{,}0194 + 0{,}0055\ x$ $r^2 = 0{,}9990$

Es konnte gezeigt werden, daß bei allen drei Wellenlängen Linearität herrscht, so daß bei jeder gemessen werden kann. Allerdings ist die Empfindlichkeit bei einer Meßwellenlänge von 230 nm kleiner als bei 220 nm, und da wiederum geringer als bei 210 nm. Man kann durch Detektion bei 210 nm eine Empfindlichkeitssteigerung um ca.

den Faktor 2 erreichen.

-Eichgeraden für Sulfamethoxazol

Die zu erwartenden Serumwerte liegen für Sulfamethoxazol zwischen 10 und 70 µg/ml. Deshalb wurden die Eichgeraden über diesen Bereich erstellt. Auch hier wurde zur Feststellung der Linearität über eine Auswertung der Peakhöhe gemacht, obwohl auch eine Flächeauswertung mit dem Integrator möglich ist.
Über eine Rheodyne Schleife 100 µl wurden wäßrige Lösungen von Sulfamethoxazol auf die Säule gegeben.

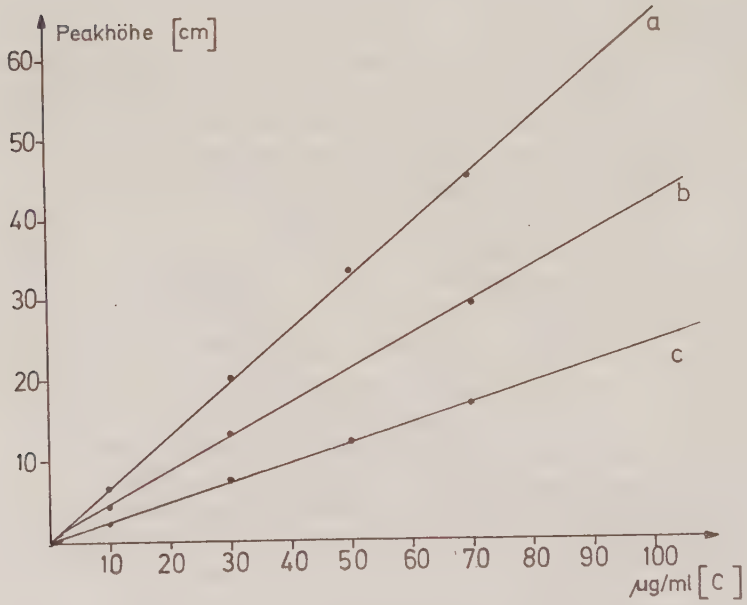


Abb.23 Eichgeraden für Sulfamethoxazol gemessen bei 210 nm (a), 220 nm (b) und 230 nm (c).

Die Errechnung der Eichgeraden ergab folgende Werte:

210 nm $y = 0{,}6863 + 0{,}6436\ x$ $r^2 = 0{,}9980$

220 nm $y = 0{,}5593 + 0{,}4114\ x$ $r^2 = 0{,}9991$

230 nm $y = 0{,}2695 + 0{,}2390\ x$ $r^2 = 0{,}9986$

Die Empfindlichkeit bei einer Wellenlänge von 210 nm ist um den Faktor 2,7 größer als bei 230 nm.

Bei dieser praktizierten Methode der Höhenauswertung muß für jede Säule eine eigene Eichgerade erstellt werden. Doch es konnte gezeigt werden, daß in allen drei Wellenbereichen Linearität besteht, so daß 3 Proben für die Erstellung der Eichgeraden genügen. Da die Höhe eines Peaks von der Bodenzahl einer Säule abhängt, ist es darüberhinaus notwendig, von Zeit zu Zeit definierte Eichlösungen auf die Säule zu geben und somit zu überprüfen, ob sich die Qualität der Säule verschlechtert hat. Diese Probleme stellen sich bei einer Integratorauswertung nicht, so daß später bei der Auswertung des Sulfamethoxazols die Flächenauswertung bevorzugt wurde.

-Humanserum gemessen bei 210, 220 und 230 nm.

Beim Chromatographieren enteiweißter Seren von Probanden die keinerlei Arzneimittel zu sich genommen hatten, wurde festgestellt, daß einige bei einer Detektion mit 210 nm Peaks an der Stelle zeigen, wo sonst Trimethoprim eluiert wird.

Beim Vergleich der drei Chromatogramme in Abb.24 fällt auf, daß bei der Detektion mit 210 nm oder 220 nm noch sehr starke Störpeaks an der Stelle im Chromatogramm kommen, an der sonst Trimethoprim seinen Platz hat. Erst bei einer Detektion mit 230 nm gehen diese Störpeaks in ein Rauschen über, das eine quantitative Bestimmung von Trimethoprim zuläßt. Der Vergleich mit Leerseren anderer Probanden zeigte, daß es sich bei den oben wiedergegebenen

Störpeaks um Extremwerte handelte. Um mögliche Fehlerquellen auszuschließen ist es besser, im Serum bei 230 nm zu detektieren.

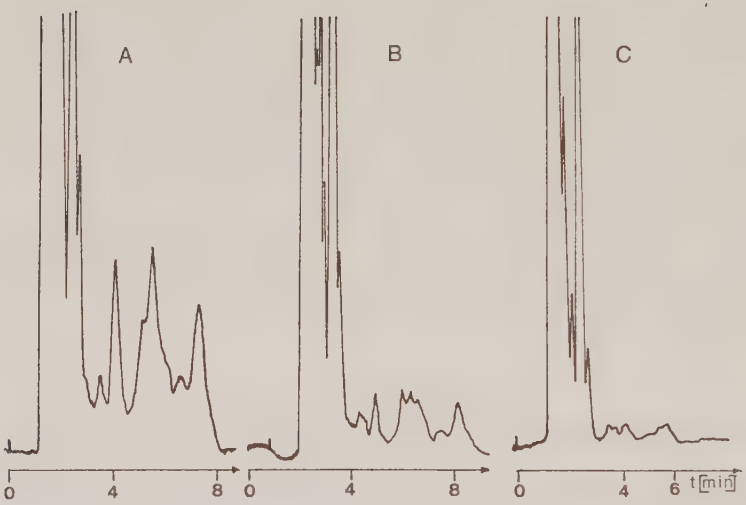


Abb.24 Chromatogramme eines enteiweißten Serums gemessen bei 210 nm (A), 220 nm (B) und 230 nm (C).
FM: Phosphatpuffer 5,4 5 Teile/
Acetonitril 1 Teil
LiChrosorb^{R} RP 8 7/um
Säule 250 nm lang ø 3 mm
Durchfluß 1,2 ml/min

3. Trennung im Harn vor und nach saurer Hydrolyse

Die chromatographischen Daten konnten wie bei der Blutspiegelbestimmung beibehalten werden. Durch den Einsatz des Fließmittelgemisches Phosphatpuffer pH 5,4 - Acetonitril (500 ml+ 100 ml) gelang auch im Urin eine deutliche Abtrennung der Arzneistoffe Trimethoprim, Sulfamethoxazol und des Metaboliten N-4-Acetylsulfamethoxazol von den sonstigen Urinbestandteilen.

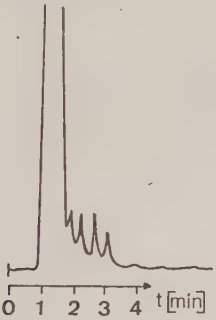


Abb.25 HPLC-Chromatogramm von Urin ohne Arzneistoffe
mit Wasser 1+10 verdünnt
FM: Phosphatpuffer 5,4 5 Teile/
Acetonitril 1 Teil
LiChrosorb^{R} RP 8 7/um
Säule 250 mm lang ø 3 mm
Durchfluß 1,2 ml/min

Aus Abb.25 ist ersichtlich, daß im Chromatogramm von Urin keine Störpeaks in dem Bereich der Arzneistoffe sind.

-Chromatographische Bestimmung vor der Hydrolyse

Eine Bestimmung vor der Hydrolyse ermöglicht Aussagen über den Gehalt an freiem Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol und somit über den Metabolisierungsgrad.

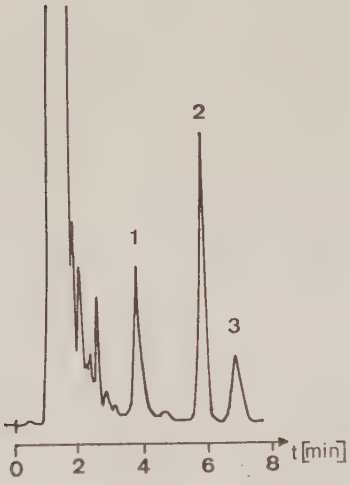


Abb.26 Chromatogramm von Urin, 1+10 mit Wasser verdünnt; eines Probanden, 24 Stunden gesammelt, nach Einnahme von Co-trimoxazol.

FM: Phosphatpuffer pH 5,4 5 Teile/
Acetonitril 1 Teil
LiChrosorb^{R} RP 8 7/um
Säule 250 mm lang, ø 3 mm
Durchfluß 1,2 ml/min

Peak 1: Trimethoprim
Peak 2: N-4-Acetylsulfamethoxazol
Peak 3: Sulfamethoxazol

Da die Konzentration aller drei Stoffe im Urin höher ist als im Serum, kann die Detektorempfindlichkeit von 0,1 A auf 1 A für Zeigervollausschlag verstellt werden. Dadurch wird das Rauschen stark verringert und so auch für Trimethoprim eine Integratorauswertung möglich.

-Chromatographische Bestimmung nach der Hydrolyse

Für die Beurteilung der biologischen Verfügbarkeit im kumulierten Urin ist eine Bestimmung der Gesamtmenge an ausgeschiedenen Arzneistoffen nötig. Die konjugierten Metaboliten können erst nach vorheriger Hydrolyse erfaßt werden. Gleichzeitig wird N-4-Acetylsulfamethoxazol durch Abspaltung der Acetylgruppe in Sulfamethoxazol zurückverwandelt. Die Hydrolyse erfolgte durch Zugabe von Salzsäure.

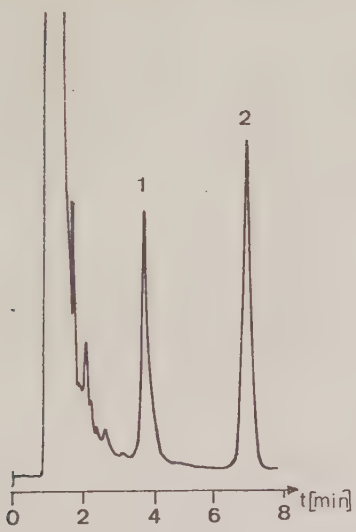


Abb.27 Chromatogramm von hydrolysiertem Urin, 1+10 mit Wasser verdünnt, eines Probanden, 24 Stunden gesammelt, nach Einnahme von Co-trimoxazol.

FM: Phosphatpuffer pH 5,4 5 Teile/
Acetonitril 1 Teil
LiChrosorb^{R} RP 8 7 µm
Säule 250 mm lang ⌀ 3 mm
Durchfluß 1,2 ml/min

Peak 1: Trimethoprim
Peak 2: Sulfamethoxazol

4. Zuverlässigkeit der Methode

Die Zuverlässigkeit einer Methode ist schwierig zu definieren, da sie durch eine Reihe von Faktoren bestimmt wird, denen von Fall zu Fall, je nach dem praktisch-medizinischen Zweck ein unterschiedliches Gewicht zugemessen wird.

Die wichtigsten Zuverlässigkeitskriterien[30] sind:

- Spezifität
- Richtigkeit
- Wiederfindung
- Präzision
- Empfindlichkeit

-Spezifität

Die Spezifität ist die Erfassung einer bestimmten chemischen Substanz unter Ausschluß anderer. Die Spezifität ist durch die chromatographische Trennung der Arzneistoffe untereinander und von den Serumbestandteilen gegeben.

-Richtigkeit

Ein wichtiger Hinweis auf die Richtigkeit sind die Eichgeraden.
Die Richtigkeit einer Methode hängt weiterhin von den systematischen Fehlern ab, die sich als gleichgerichtete Abweichungen vom wahren Gehalt einer Kontrollprobe zeigen. Die Richtigkeit wird durch den Mittelwert $\bar{x}$ ausgedrückt, der nach folgender Formel errechnet wird:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma \cdot x}{n}$$

Zur Ermittlung des Mittelwertes wurden wäßrige Lösungen von je 1000 ng Trimethoprim und 50 µg Sulfamethoxazol über eine Rheodyne Schleife auf die Säule gegeben und anhand der Eichgeraden die Werte bestimmt.

Es gilt: Trimethoprim $\bar{x}$ 1006,6 ng;
Sulfamethoxazol $\bar{x}$ 50,44 ng

Die Anzahl der Messungen war 10.

-Wiederfindung

Ein weiterer wichtiger Test ist die Wiederfindung im Serum. Es ist zu erwarten, daß durch die Proteinfällung auch Arzneistoffe mitgerissen werden, die der quantitativen Erfassung entgehen. Deshalb wurde untersucht, wieviel Prozent einer dem Serum zugesetzten Menge an Arzneistoffen nach der Enteiweißung wiedergefunden werden.
Pro ml Serum wurden 1000 ng Trimethoprim und 40 µg Sulfamethoxazol zugesetzt.
Für Trimethoprim wurde eine Wiederfindung von 78,3 ± 2,7% für Sulfamethoxazol von 88,5 ± 1,5% ermittelt.

Die Anzahl der Messungen betrug 12.

-Präzision

Die Präzision, auch Genauigkeit oder Reproduzierbarkeit genannt, hängt von der Größe und der Zahl der zufälligen Fehler ab, die dafür verantwortlich sind, daß bei wiederholter Analyse derselben Substanz trotz gleichbleibender Konzentration keine identischen Ergebnisse erhalten werden. Das Auftreten von zufälligen Fehlern läßt sich mathematisch statistisch beschreiben; hierzu wird die Berechung der Standardabweichung nach der Formel

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$$

herangezogen. Dabei entspricht n der Anzahl der Einzelwerte, $\bar{x}$ dem Mittelwert und x dem Einzelwert.
Als ausreichende Präzision wird angesehen, wenn die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) 5% nicht überschreitet[31)]

Zwei Präzisionskontrollen sind in der Praxis üblich:

- die Präzision in der Serie
- die Präzision von Tag zu Tag

Präzision in der Serie

Hierzu wurden 10 Bestimmungen einer Standardlösung an einem Tag hintereinander durchgeführt. Die Standardabweichungen betrugen:

für Trimthoprim 18,5 ng bei einem Mittelwert von 1000,6 ng (VK = 1,85%)
für Sulfamethoxazol 0,39 µg bei einem Mittelwert von 50,44 µg (VK = 0,8%)

Präzision von Tag zu Tag

Hierzu wurden an 20 Tagen jeweils eine Bestimmung einer Standardlösung durchgeführt, die 1000 ng Trimethoprim und 50 µg Sulfamethoxazol enthielt. Es gelten folgende Werte:

für Trimethoprim 31,3 ng bei einem Mittelwert von 997,8 ng (VK = 3,1%)
für Sulfamethoxazol 0,73 µg bei einem Mittelwert von 50,11 µg (VK = 1,5%)

-Empfindlichkeit

Unter der Empfindlichkeit versteht man den geringsten auffindbaren Betrag, der sich signifikant von Null unter-

scheidet.
Dieser Betrag liegt für Trimethoprim bei

50 - 100 ng/ml

für Sulfamethoxazol bei

0,5 - 1 µg/ml

5. Vergleich mit anderen HPLC-Methoden

Die hier vorgeschlagene HPLC-Methode zur Bestimmung von Trimethoprim und Sulfamethoxazol im Serum und Harn hat gegenüber den Methoden von Bye[18], Bury[20], Harzer[23] und Weinfeld[6] den Vorteil, daß beide Stoffe simultan bestimmt werden können. Sowohl Bye als auch Bury chromatographieren die Arzneistoffe getrennt mit verschiedenen Fließmitteln. Harzer und Weinfeld erfassen nur Sulfamethoxazol bzw. Trimethoprim. Simultanbestimmungen aus biologischem Material werden von Ferry[19] und Vree[9] beschrieben. Nach der Methode Ferry müssen die Arzneistoffe vor der Probenaufgabe in 2 getrennten Arbeitsgängen aus dem Serum extrahiert werden, welches einen relativ hohen Zeit- und Arbeitsaufwand erfordert. Unsere Methode enthält als Probenvorbereitung lediglich eine Eiweißpräzipitation. Darüberhinaus konnte gegenüber Ferry eine bessere Basislinientrennung der Substanzen verwirklicht werden. Dies ermöglicht eine bessere quantitative Bestimmung. Die Vorteile der Simultanbestimmung nach Proteinfällung bietet auch die Methode von Vree, doch mit einer Erfassungsgrenze von 750 ng/ml Serum können damit die Blutspiegelwerte von Trimethoprim nur über einen Zeitraum von wenigen Stunden gemessen werden. Mit unserer Methode können noch 100 ng/ml Trimethoprim erfaßt werden.

Die Vorteile der ausgearbeiteten HPLC-Bestimmungsmethode liegen in der Simultanbestimmung von Trimethoprim und Sulfamethoxazol neben N-4-Acetylsulfamethoxazol im Serum und im Harn bei einer guten Basislinientrennung der Arzneistoffe untereinander, dem Metaboliten N-4-Acetylsulfamethoxazol und den Serum- bzw. Harnbestandteilen. Die einfache Probenvorbereitung macht lediglich im Serum eine Proteinfällung notwendig, während Harn direkt eingespritzt werden kann. Die Empfindlichkeit reicht aus, beide Stoffe über einen längeren Zeitraum im Serum zu erfassen und so Blutspiegelkurven zu erstellen.

III Bestimmung zur biologischen Verfügbarkeit

1.Blutspiegelbestimmung

1.1. Versuchsdurchführung

6 gesunde Probanden nahmen morgens um acht Uhr nach einem einheitlichen Frühstück 160 mg Trimethoprim und 800 mg Sulfamethoxazol in Form von zwei Tabletten Eusaprim^{R} ein. Die Probanden waren hinsichtlich ihres Alters und Gewichtes ziemlich einheitlich. Die Einzelgewichte wichen vom Mittelwert nur in einem Falle um zwölf Prozent ab, in den anderen Fällen lagen sie alle darunter. Die Probanden nahmen keine Medikamente zu sich.

Tab.4 Übersicht über Alter, Geschlecht und Gewicht der Probenden.

Proband	Alter	Geschlecht	Gewicht kg
E.U.	40	weibl.	65
S.N.	22	männl.	60
H.S.	24	männl.	85
N.M.	20	männl.	70
F.B.	20	männl.	66
I.R.	28	männl.	78

Die Probanden erhielten zunächst alle die oben erwähnten Substanzen in Form von zwei Tabletten Eusaprim^{R}, die mit 100 ml Wasser eingenommen wurden. Daraufhin wurden Blutproben 1,2,3,6,10,14 und 18 Stunden nach der Gabe der Tabletten gewonnen. Dazu wurden 4 ml Blut aus der Armvene entnommen und in heparinisierte Zentrifugenröhrchen

gegeben. Das Plasma wurde durch Zentrifugation gewonnen. Danach wurden die Plasmaproben in der Tiefkühltruhe bei minus 20°C eingefroren.

Vor der Gabe der Substanzen wurden von jedem Probanden 2 ml Plasma als Probenleerwert gewonnen.

Während der ganzen Versuchsdauer hielten sich alle Probanden unter einheitlichen Bedingungen auf und nahmen ca. 1,5 Liter Flüssigkeit zu sich.

Vierzehn Tage später wurden den gleichen Probanden die gleiche Menge an Trimethoprim und Sulfamethoxazol in Form von Eusaprim^{R} Suspension für Erwachsene verabreicht. Die Suspension wurde vor Gebrauch geschüttelt. Die Probanden erhielten jeweils zwei mal fünf ml Suspension und danach 100 ml Wasser. Die Blutproben wurden wie oben beschrieben in den gleichen Zeitabständen genommen und zu Plasma verarbeitet.

1.2. Kreatininwerte im Serum

Die Bestimmung des Kreatinins im Serum gilt heute als der wichtigste Suchtest auf eine eingeschränkte Nierenfunktion bei einer Nephropathie.
Als Normbereiche der Kreatininkonzentration im Serum werden angesehen[32]:

Männer	0,64 - 1,04	mg/100 ml
	57 - 92	µmol/l
Frauen	0,57 - 0,95	mg/100 ml
	50 - 81	µmol/l

Diese Untersuchung muß deswegen durchgeführt werden, da die Blutspiegel bei Nierenkranken durch verminderte bzw. erhöhte Elimination nicht als signifikant angesehen werden können.
Die Bestimmungen wurden nach Jaffé, modifiziert nach Löhberg[33] durchgeführt.

Tab.5 Kreatininwerte im Serum der Probanden

Proband	Kreatiningehalt mg/100 ml
E.U.	0,91
S.N.	0,87
H.S.	0,85
N.M.	0,94
F.B.	0,81
I.R.	0,91

Die Kreatininwerte aller Probenden liegen im Normbereich.

1.3. Auswertung der Ergebnisse

1.3.1. Meßwerte

Tab.6 Serumkonzentrationen/ml von Trimethoprim und Sulfamethoxazol der 6 Probanden nach Einnahme von Eusaprim^{R} Tabletten und Suspension.

Proband	Probennr.	Präparat	Entnahmezeit Std. nach Einn.	TMP ng/ml	SMZ /ug/ml
E.U.	1 (Leerpr.)				
	2	Tabl.	1	738	15,2
	3	"	2	1458	52,6
	4	"	3	1350	50,28
	5	"	6	1059	40,2
	6	"	10	872	28,8
	7	"	14	472	23,9
	8	"	18	392	15,2

Proband	Probennr.	Präparat	Entnahmezeit Std.n.Einn.	TMP ng/ml	SMZ /ug/ml
S.N.	9 (Leerpr.)				
22 J.	10	Tabl.	1	1537	28,6
	11	"	2	1557	49,5
	12	"	3	1428	48,5
	13	"	6	1176	39,8
	14	"	10	961	30,9
	15	"	14	598	22,8
	16	"	18	403	14,8
H.S.	17 (Leerpr.)				
24 J.	18	Tabl.	1	1148	27,4
	19	"	2	1254	46,7
	20	"	3	1149	39,95
	21	"	6	807	29,8
	22	"	10	540	21,3
	23	"	14	283	16,5
	24	"	18	190	11,1
N.M.	25 (Leerpr.)				
24 J.	26	Tabl.	1	1207	28,3
	27	"	2	1610	50,3
	28	"	3	1433	50,5
	29	"	6	1023	38,96
	30	"	10	668	26,95
	31	"	14	416	20,1
	32	"	18	283	12,3
F.B.	33 (Leerpr.)				
20 J.	34	Tabl.	1	1675	40,7
	35	"	2	1692	52,0
	36	"	3	1455	47,9
	37	"	6	1100	36,3
	38	"	10	797	23,7
	39	"	14	549	18,2
	40	"	18	441	12,3

Proband	Probennr.	Präparat	Entnahmezeit Std.n.Einn.	TMP ng/ml	SMZ /ug/ml
I.R.	49 (Leerpr.)				
28 J	50	Tabl.	1	1407	33,1
	51	"	2	1563	46,7
	52	"	3	1322	47,3
	53	"	6	1031	32,3
	54	"	10	894	22,1
	55	"	14	628	15,5
	56	"	18	501	11,2
E.U.					
40 J.	57	Susp.	1	1049	33,7
	58	"	2	1755	58,4
	59	"	3	1574	53,5
	60	"	6	1202	40,7
	61	"	10	884	28,1
	62	"	14	528	20,7
	63	"	18	437	14,3
S.N.					
22 J.	64	Susp.	1	1271	40,9
	65	"	2	1418	50,4
	66	"	3	1235	42,2
	67	"	6	1120	36,6
	68	"	10	922	28,4
	69	"	14	557	19,9
	70	"	18	323	14,2
H.S.					
24 J.	71	Susp.	1	1042	26,9
	72	"	2	1136	36,7
	73	"	3	918	32,6
	74	"	6	731	23,2
	75	"	10	494	17,1
	76	"	14	288	13,1
	77	"	18	177	8,8

Proband	Probennr.	Präparat	Entnahmezeit Std. n.Einn.	TMP ng/ml	SMZ µg/ml
N.M.	78	Susp.	1	1148	31,9
24 J.	79	"	2	1324	45,4
	80	"	3	1120	41,2
	81	"	6	914	28,9
	82	"	10	583	20,5
	83	"	14	344	14,6
	84	"	18	194	9,6
F.B.	85	Susp.	1	1577	31,6
20 J.	86	"	2	1598	51,7
	87	"	3	1364	45,5
	88	"	6	1146	36,5
	89	"	10	826	25,2
	90	"	14	552	20,1
	91	"	18	367	14,2
I.R.	99	Susp.	1	1033	25,98
28 J.	100	"	2	1419	46,00
	101	"	3	1074	37,8
	102	"	6	933	31,0
	103	"	10	772	22,4
	104	"	14	540	16,3
	105	"	18	428	9,5

Aus den Meßwerten der einzelnen Probanden wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet (Tab.36,37,38,39)
Die Mittelwerte bildeten die Grundlage zur:

- Erstellung der Eliminationsgleichungen
- Erstellung von Blutspiegel-Zeit-Kurven
- Ermittlung der biologischen Verfügbarkeiten im Serum
- Berechung der Eliminationshalbwertszeiten.

1.3.2. Eliminationsgleichungen

Nach einer intravenösen Applikation einer Verbindung fällt die Konzentration dieses Stoffes im Blutkompartiment exponentiell ab, da die Eliminiationsgeschwindigkeit von Pharmaka und ihren Metaboliten nach einem übergeordneten Geschwindigkeitsgesetz 1.Ordnung beschrieben werden kann.
Die Abnahme der Konzentration gegen die Zeit ist folgendermaßen zu formulieren[34]:

$$-\frac{dy}{dt} = k_2 y \qquad (1)$$

Es handelt sich um eine Differentialgleichung, die sich integrieren läßt, und dann zu folgender Beziehung führt:

$$y = y_o \cdot e^{-k_2 t} \qquad (2)$$

Es bedeuten: y Konzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt t
y_o Fiktive Anfangskonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$
e Basis des natürlichen Logarithmus
k_2 Eliminationskonstante

Wird dem Organismus das Pharmakon oral appliziert, so lassen sich konkurrierende Invasions- und Eliminationsvorgänge durch die Batemann-Funktion beschreiben:

$$y = \frac{y_o \cdot k_1}{k_1 - k_2} (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}) \qquad (3)$$

y Mengen im Blutkompartiment
k_1 Invasionskonstante
k_2 Eliminationskonstante

Eine Ermittlung der Invasionskonstanten k_1 ist mit so wenig Meßpunkten nicht möglich. Daher wurden die Eliminationsgleichungen mit den Meßwerten von der 2. bis zur 18.Stunde nach Gleichung (2) aufgestellt. Nach 2 Stunden sind die maximalen Blutspiegelwerte erreicht und man kann annehmen, daß die Invasion abgeschlossen ist.

Trimethoprim Tabletten: $y = 1797{,}4\ e^{-0{,}089\ t}$
Trimethoprim Suspension: $y = 1706{,}5\ e^{-0{,}090\ t}$

Sulfamethoxazol Tabletten: $y = 60{,}08\ e^{-0{,}084\ t}$
Sulfamethoxazol Suspension: $y = 55{,}53\ e^{-0{,}085\ t}$

-Fiktive Anfangskonzentration y_o

Die in der Eliminationsgleichung dargestellte Exponentialfunktion stellt im linearen Raster eine typische Kurve, im halblogarithmischen Raster eine Gerade dar. Durch eine Verlängerung der Geraden bis zum Schnittpunkt mit der Ordinaten t = O wird jene Konzentration erhalten (y_o), die sich ergeben würde, wenn zum Zeitpunkt der Aufnahme des Arzneistoffes bereits ein Diffusionsgleichgewicht im Verteilungsraum bestanden haben würde. Durch diese Extrapolierung der Konzentrationsverlaufskurve bis zur Anfangszeit wird man unabhängig von Invasions- und Eliminationsvorgängen.

-Eliminationskonstanten

Die Eliminationskonstante k_2 sagt aus, wieviel von der im Verteilungsvolumen vorhandenen Substanz pro Zeiteinheit umgesetzt wird. Sie ist ein direktes Maß der Eliminationsgeschwindigkeit und steht zu ihr in einem reziproken Verhältnis. Es handelt sich um eine Standardgröße, die von biologischen Schwankungen abgesehen bei gleichem Stoff unter den gleichen Bedingungen den gleichen Wert hat.

Trimethoprim Tabletten k_2 = 0,089
Trimethoprim Suspension k_2 = 0,090

Sulfamethoxazol Tabletten k_2 = 0,084
Sulfamethoxazol Suspension k_2 = 0,085

1.3.3. Blutspiegel-Zeit-Kurven

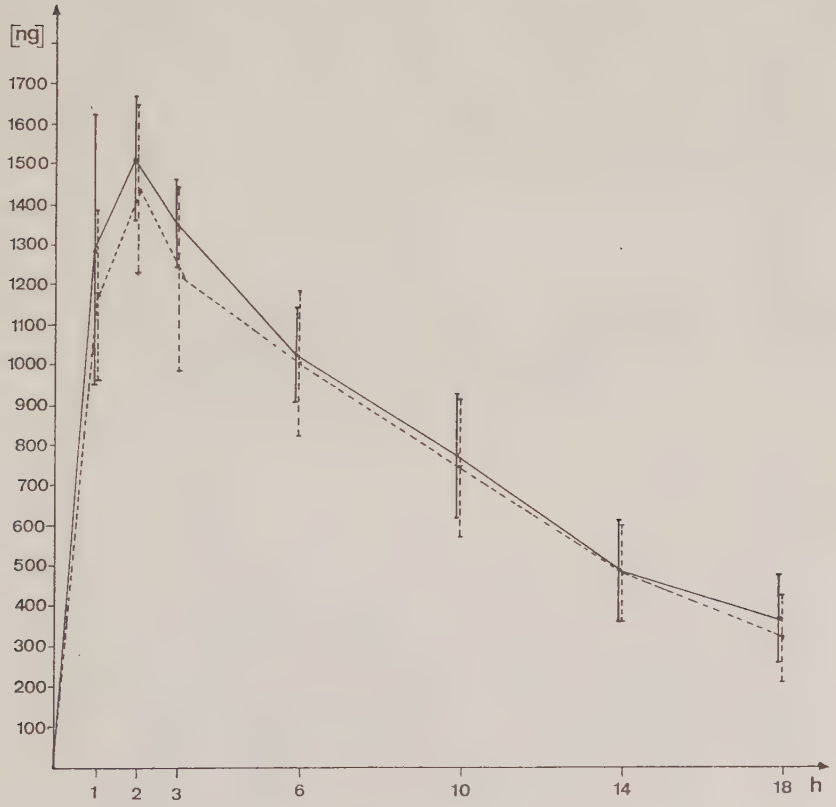


Abb.28 Blutspiegelkurven von Trimethoprim nach oraler Einnahme von Co-trimoxazol in Form von 2 Tabletten (——) bzw. 2x5 ml Suspension (---) mit Angabe der Standardabweichungen.

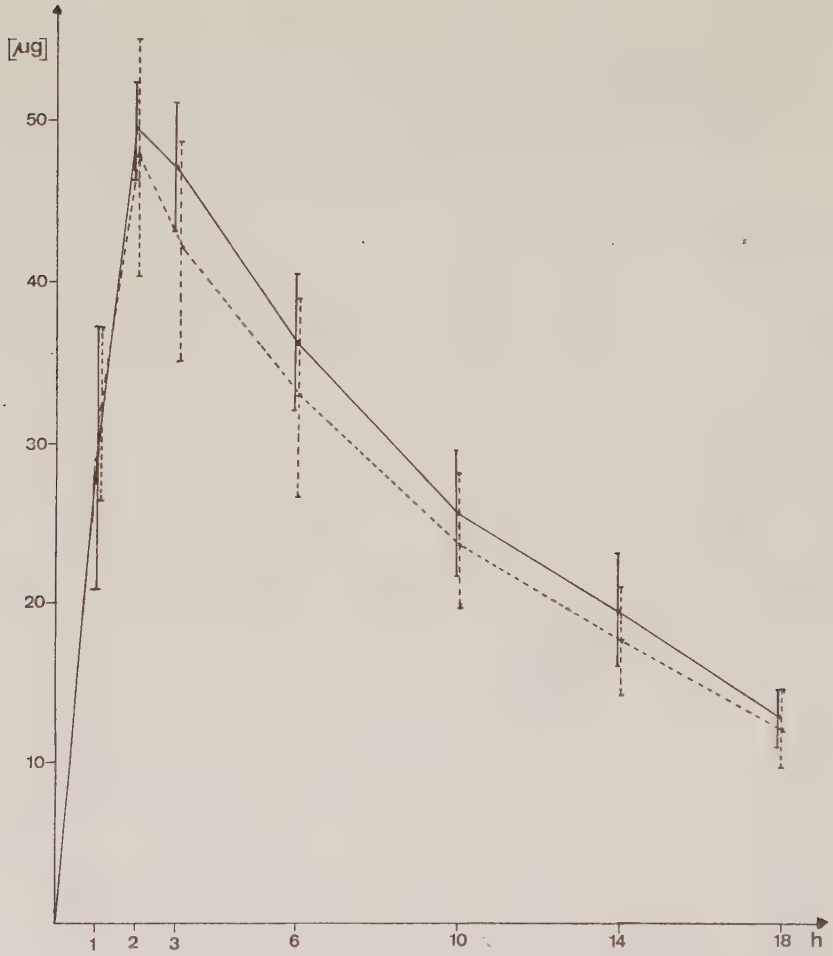


Abb.29 Blutspiegelkurven von Sulfamethoxazol nach Einnahme von Co-trimoxazol in Form von 2 Tabletten (——), bzw. 2x5 ml Suspension (---) mit Angabe der Standardabweichungen.

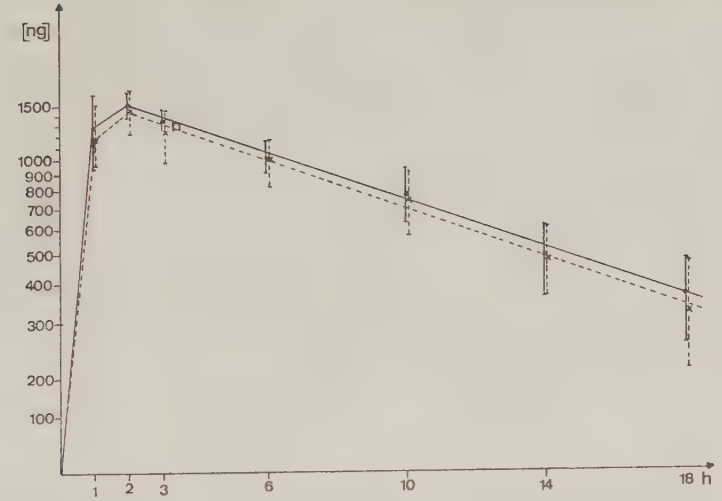


Abb.30 Halblogarithmische Darstellung der Blutspiegelkurven von Trimethoprim nach oraler Einnahme von Co-trimoxazol in Form von 2 Tabletten (——), bzw. 2x5 ml Suspension (---) mit Angabe der Standardabweichungen.

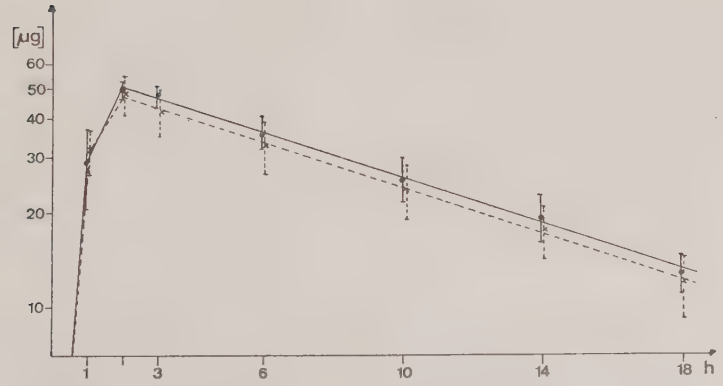


Abb.31 Halblogarithmische Darstellung der Blutspiegelkurven von Sulfamethoxazol nach oraler Einnahme von Co-trimoxazol in Form von 2 Tabletten (——), bzw. 2x5 ml Suspension (---) mit Angabe der Standardabweichungen.

1.3.4. Biologische Verfügbarkeit im Serum

Verfolgt man die Konzentration eines Stoffes im Blutplasma und trägt graphisch die erhaltenen Werte gegen die Zeit auf, so ist die Fläche unter der Blutspiegel-Zeit-Kurve proportional der in das Blut aufgenommenen Fraktion der applizierten Dosis.

Die Fläche S unter der Blutspiegelkurve läßt sich errechnen nach[35)]

$$S = \int_0^\infty y_o \cdot e^{-k_2 t} dt$$

Nach Integration ergibt sich daraus:

$$S = \frac{y_o}{k_2}$$

Trimethoprim Tabletten S = 20 196
Trimethoprim Suspension S = 18 962

Sulfamethoxazol Tabletten S = 715,3
Sulfamethoxazol Suspension S = 653,3

Durch Division der Flächen unter den Blutspiegelkurven von Tabletten und Suspension, erhält man die relative Bioverfügbarkeit. Setzt man die Flächen unter den Blutspiegelkurven, die nach Tabletteneinnahme erhalten wurden gleich 100%, ergibt sich die relative Bioverfügbarkeit der Suspension in Prozent.

Die relative Bioverfügbarkeit der Suspension entspricht für

Trimethoprim 93,9%
Sulfamethoxazol 91,3%

1.3.5. Eliminationshalbwertszeiten

Die Eliminationshalbwertszeit ist die Zeit, in der die Konzentration eines Stoffes jeweils um die Hälfe absinkt.

Sie kann auf der Geraden in der halblogarithmischen Darstellung direkt abgegriffen oder aus der Eliminationsgleichung errechnet werden. Die Eliminationshalbwertszeit ist eine wichtige Meßgröße. Sie wird als biologische Stoffwechsel-Standardgröße angesehen, d.h. bei gleichem Stoff und unter gleichen Bedingungen ergibt sich für sie stets der gleiche Wert.
Die Eliminationshalbwertszeiten betragen für

Trimethoprim nach Tabletteneinnahme	7,8 Stunden
Trimethoprim nach Suspensionseinnahme	7,7 Stunden
Sulfamethoxazol nach Tabletteneinnahme	8,25 Stunden
Sulfamethoxazol nach Suspensionseinnahme	8,15 Stunden.

2. Kumulative Urinausscheidung

Die Messung der kumulativen Urinausscheidung von Trimethoprim und Sulfamethoxazol gestattet die Bestimmung der Bioverfügbarkeit verschiedener Darreichungsformen eines Medikamentes. Üblicherweise wird die nach intravenöser Gabe eines Medikamentes ausgeschiedene Menge willkürlich 100% gesetzt und die nach Gabe einer anderen, meist oralen, Darreichungsform ausgeschiedene Menge bei gleicher Dosis als entsprechender Prozentanteil angegeben. Dieser Wert wird dann als absolute Bioverfügbarkeit der oralen Form bezeichnet. Vergleicht man die ausgeschiedenen Arzneimittelmengen zweier oraler Zubereitungen miteinander, dann erhält man die relative Bioverfügbarkeit.

2.1. Versuchsdurchführung

Sechs gesunde Probanden nahmen morgens nach dem Frühstück um acht Uhr 160 mg Trimethoprim und 800 mg Sulfamethoxazol in Form von 2 Tabletten Eusaprim^{R} ein. Danach sammelten sie vierundzwanzig Stunden den Urin in sterili-

sierten Glasflaschen. Alle Probanden tranken innerhalb dieser Zeit ca. 1,5 l Flüssigkeit. Dem Harn wurde zur Konservierung eine 10 prozentige Thymollösung zugesetzt[36].

Zwei Wochen später wurde den gleichen Probanden dieselbe Menge Arzneistoff in Form von 10,0 ml Eusaprim^{R} Suspension verabreicht. Die Suspension wurde mit einer 10 ml Vollpipette dosiert.

Die Probanden wurden aufgefordert, vor Beginn der Sammelperiode die Blase zu entleeren, ebenso am Ende nach 24 Stunden.

Der gesammelte Harn eines jeden Probanden wurde gut durchgemischt, die Menge ermittelt und ein Teil als Durchschnittsprobe entnommen.

Tab.7 Übersicht über Alter, Geschlecht und Gewicht der Probenden

Proband	Alter	Geschlecht	Gewicht kg
B.R.	28	weibl.	55
G.J.	30	männl.	70
G.L.	24	weibl.	57
F.R.	30	männl.	70
A.S.	24	männl.	65
W.R.	28	männl.	72

2.2. Kreatininwerte im Harn

Die Messung des Kreatiningehalts im Urin dient dazu, die Vollständigkeit von 24-Stunden-Urinsammlungen zu prüfen. Die Bestimmung des Kreatininkoeffizienten (mg Kreatinin/kg Körpergewicht/24 h) beruht auf der Beobachtung, daß die Kreatininausscheidung/kg Körpergewicht während 24 Stunden relativ konstant ist[37]. Bei

normaler Nierenfunktion ist die Kreatininsynthese und die Kreatininurie direkt der Muskelmasse proportional. Die Kreatininwerte wurden mit der Methode Jaffé,modifiziert nach Löhberg[33] bestimmt.

Tab. 8 Menge des Sammelurins, pH Werte und Kreatininwerte der Harnproben nach Einnahme von Co-trimoxazol Tabletten.

Proband	Gesamtausscheidung Urin in ml 24 h	pH	Kreatiningehalt mg/kg/24 h
B.R.	965	6,7	16,1
G.J.	910	5,9	24,0
G.L.	1235	6,5	20,6
F.R.	2160	6,2	23,2
A.S.	1555	6,3	22,2
W.R.	1530	6,6	20,4

Tab.9 Menge des Sammelurins, pH Werte und Kreatininwerte der Harnproben nach Einnahme von Co-trimoxazol Suspension.

Proband	Gesamtausscheidung Urin in ml 24 h	pH	Kreatiningehalt mg/kg/24 h
B.R.	1440	6,7	17,8
G.J.	1200	5,8	25,1
G.L.	1200	6,2	16,9
F.R.	2050	6,6	21,8
A.S.	2090	6,8	29
W.R.	1025	6,3	19,7

Die Kreatininwerte zeigten nur bei einem Probanden eine auffallende Abweichung. Diese kann mit einer erhöhten sportlichen Aktivität des Probanden erklärt werden, da die Kreatininausscheidung bei starken körperlichen Anstrengungen ansteigt[37].

2.3. Auswertung der Ergebnisse

Der Urin wurde vor und nach saurer Hydrolyse untersucht. Die Bestimmung nach der Hydrolyse ergibt den Gesamtgehalt an ausgeschiedenen Arzneimitteln, die Messung im nicht hydrolysierten Urin ermöglicht Aussagen über den Metabolisierungsgrad von Sulfamethoxazol. Im hydrolysierten Harn wurden Trimethoprim und Sulfamethoxazol, im nichthydrolysierten Harn Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol bestimmt.

-nach Hydrolyse

Tab.10 Gehalt an Trimethoprim und Sulfamethoxazol im 24-Stunden-Urin nach Einnahme von 2 Tabletten Co-trimoxazol.

Proband	Trimethoprim /ug/ml	Sulfamethoxazol /ug/ml	Trimethorpim mg gesamt	Sulfamethoxazol mg gesamt
B.R.	84,2	498,6	81,2	481,1
G.J.	79,0	375,1	71,9	341,4
G.L.	51,6	364,3	63,7	449,9
F.R.	43,9	200,5	94,9	434,0
A.S.	39,4	278,6	61,3	433,2
W.R.	55,7	271,8	85,2	415,8

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der insgesamt ausgeschiedenen Arzneistoffmengen betragen:

Trimethoprim $\bar{x}$ 76,37 mg s 13,1 mg
Sulfamethoxazol $\bar{x}$ 425,9 mg s 46,9 mg

Berechnet in Prozent der Gesamteinnahme wurden im 24-Stunden-Urin nach Einnahme von 2 Tabletten Co-trimoxazol (≙160 mg Trimethoprim und 800 mg Sulfamethoxazol) ausgeschieden:

Trimethoprim 48% ± 8,2%
Sulfamethoxazol 53,2% ± 5,9%

Tab.11 Gehalt an Trimethoprim und Sulfamethoxazol im 24-Stunden-Urin nach Einnahme von 10,0 ml Co-trimoxazol Suspension.

Proband	Trimethoprim /ug/ml	Sulfamethoxazol /ug/ml	Trimethoprim mg gesamt	Sulfamethoxazol mg gesamt
B.R.	48,8	335,5	70,2	483,2
G.J.	74,9	338,9	89,9	406,2
G.L.	61,8	369,7	74,2	443,7
F.R.	35,5	217,0	72,8	444,8
A.S.	30,1	233,2	62,9	487,4
W.R.	73,9	382,6	75,8	392,1

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der insgesamt ausgeschiedenen Arzneistoffmengen betragen:

Trimethoprim $\bar{x}$ 74,3 mg s 8,9 mg
Sulfamethoxazol $\bar{x}$ 442,9 mg s 38,8 mg

Im 24-Stunden-Urin wurden nach Einnahme von 10,0 ml Co-trimoxazol Suspension (≙ 160 mg Trimethoprim und 800 mg Sulfamethoxazol) berechnet in Prozent der Gesamteinnahme ausgeschieden:

46,4% ± 5,6% Trimethoprim
55,4% ± 4,9% Sulfamethoxazol

Die Ergebnisse zeigen, daß bei exakter Dosierung der Suspension kein signifikanter Unterschied in der Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe Trimethoprim und Sulfamethoxazol im Vergleich mit den Tabletten besteht. Bei der Dosierung der Suspension mit dem Meßlöffel wurden erheblich niedrigere Werte gefunden. In einer Versuchsreihe ließen wir die Probanden die Suspension selbst dosieren. Sie nahmen 2 Meßlöffel ($\hat{=}$ 10 ml) Co-trimoxazol Suspension ein. Im 24-Stunden-Urin wurden danach 15% weniger Trimethoprim und 19% weniger Sulfamethoxazol ausgeschieden (Tab.41,42 im experimentellen Teil).

-vor Hydrolyse

Tab.12 Gehalt an freiem Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol im 24-Stunden-Urin nach Einnahme von 2 Tabletten Co-trimoxazol.

Proband	Sulfamethoxazol µg/ml	Sulfamethoxazol mg gesamt	N-4-Acetylsulfamethoxazol µg/ml	N-4-Acetylsulfamethoxazol mg gesamt
B.R.	131,4	126,8	371,3	358,3
G.J.	37,9	34,5	320,1	291,3
G.L.	117,9	145,6	278,8	336,9
F.R.	13,1	28,2	186,6	403,0
A.S.	91,2	141,8	205,8	320,0
W.R.	53,9	82,5	226,4	346,4

Die Mittelwerte und Standardabweichungen betragen:

freies Sulfamethoxazol $\bar{x}$ 93,2 mg s 52,9 mg
N-4-Acetylsulfamethoxazol $\bar{x}$ 342,6 mg s 37,6 mg

Subtrahiert man nun von dem Gesamtgehalt an Sulfamethoxazol, der nach saurer Hydrolyse erhalten wurde, den Gehalt an freiem Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfameth-

oxazol (berechnet als Sulfamethoxazol), so erhält man den Anteil der konjugierten Metaboliten.

Von den 425,9 mg Sulfamethoxazol, die im 24-Stunden-Urin nach Einnahme von 2 Tabletten Co-trimoxazol ausgeschieden wurden sind:

nichtmetabolisiertes Sulfamethoxazol	93,2 mg = 21,9%
N-4-Acetylsulfamethoxazol berechnet als Sulfamethoxazol	296,9 mg = 69,7%
konjugiertes Sulfamethoxazol	35,8 mg = 8,4%

Tab.13 Gehalt an freiem Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol im 24-Stunden-Urin nach Einnahme von 10,0 ml Co-trimoxazol Suspension.

Proband	Sulfamethoxazol		N-4-Acetylsulfamethoxazol	
	µg/ml	mg gesamt	µg/ml	mg gesamt
B.R.	87,1	125,4	260,4	375,3
G.J.	23,1	27,7	245,1	294,1
G.L.	88,3	106,0	278,4	334,1
F.R.	26,1	53,4	186,3	381,9
A.S.	72,3	151,1	158,0	330,2
W.R.	79,4	81,4	344,9	353,5

Die Mittelwerte und Standardabweichungen betragen:

freies Sulfamethoxazol	$\bar{x}$ 90,8 mg	s 45,9 mg
N-4-Acetylsulfamethoxazol	$\bar{x}$ 344,9 mg	s 32,5 mg

Von den 442,9 mg Sulfamethoxazol, die im 24-Stunden-Urin nach Gabe von 10,0 ml Co-trimoxazol Suspension ausgeschieden wurden, sind:

nichtmetabolisiertes Sulfamethoxazol	90,8 mg = 20,5%
N-4-Acetylsulfamethoxazol berechnet als Sulfamethoxazol	298,9 mg = 67,5%
konjugiertes Sulfamethoxazol	53,2 mg = 12,0%

Aus den Tab.12 und 13 ist ersichtlich, daß die Werte von nichtmetabolisiertem Sulfamethoxazol sehr stark streuen. Dies ist der Grund, warum zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit nicht der Gehalt an freiem Sulfamethoxazol, sondern die Gesamtmenge Sulfamethoxazol nach saurer Hydrolyse herangezogen wurde.

3. Diskussion der Ergebnisse

Allgemein übliche Verfahren zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen sind die vergleichenden Messungen der Serenkonzentrationen oder der kumulativen Urinausscheidung zweier Applikationsmethoden bzw. Darreichungsformen. Im vorliegenden Fall wurde die relative Bioverfügbarketi von Co-trimoxazol nach oraler Einnahme von Tabletten und Suspension nach beiden Verfahren bestimmt, da in der Literatur bis auf eine Ausnahme (Weinfeld) keine entsprechenden Untersuchungen existieren und Angaben über Serenkonzentrationen stark schwanken. Weinfeld vergleicht nämlich die Blutspiegelwerte nur eines Probanden nach Einnahme gleicher Co-trimoxazoldosen aus unterschiedlichen galenischen Zubereitungen des gleichen Präparates. Um aber den Einfluß von Faktoren wie Körpergewicht, Geschlecht, genetische Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus und Alter auszuschließen, ist es erforderlich, solche Untersuchungen mit mindestens 6 Personen durchzuführen.
Die Angaben in der Literatur zu den maximalen Serenkonzentrationen liegen zwischen 1,2 - 2,9 µg/ml für Trimethoprim und 36 - 86,7 µg/ml für Sulfamethoxazol. Diese Maximalwerte werden zwischen 2 und 4 Stunden erreicht. Außerdem soll nach Windorfer Trimethoprim aus der Suspension schlechter resorbiert werden als aus Tabletten.

Die Bestimmung nach der von uns entwickelten simultanen HPLC-Methode (S.86) ergab 2 Stunden nach Einnahme von 2 Tabletten Co-trimoxazol (160 mg Trimethoprim und 800 mg Sulfamethoxazol) maximale Serumwerte von 1,52 $\pm$ 0,15 µg/ml Trimethoprim und 49,8 $\pm$ 2,7 µg/ml Sulfamethoxazol. Die Serumwerte sind sowohl für Trimethoprim als auch für Sulfamethoxazol nach Einnahme der Suspension geringfügig niedriger (Trimethoprim 1,44 $\pm$ 0,21 µg/ml, Sulfamethoxazol 48,1 $\pm$ 7,3 µg/ml), wobei aber die Standardabweichungen

der Suspension die Blutspiegelkurven der Tabletten immer überlappen. Vergleicht man die Flächen unter den Blutspiegelkurven und setzt das Flächenintegral der Tabletten willkürlich 100%,so ergibt dies für die Suspension eine relative Bioverfügbarkeit des Trimethoprims von 93,1% und des Sulfamethoxazols von 91,3%. Die Unterschiede dürften auf die Dosierungsungenauigkeiten(Meßlöffel)bei der Einnahme zurückzuführen sein. Dies geht aus den entsprechenden Versuchen zur kumulativen Urinausscheidung hervor.

Die Eliminationshalbwertszeiten lassen sich aus den Mittelwerten der Serumkonzentrationen errechnen und betragen nach Tabletteneinnahme für Trimethoprim 7,8 h bei Streuungen von 5,8 h bis 10,2 h und für Sulfamethoxazol 8,15 h bei Streuungen von 7,4 h bis 9,35 h. Die Eliminationshalbwertszeiten nach Suspensionsapplikation lagen entsprechend (Trimethoprim 7,7 h, Sulfamethoxazol 8,15 h) Die Werte stimmen in etwa mit denen bei Schwartz genannten überein, der eine Blutspiegelbestimmung mit 4 gesunden Probanden nach Tabletteneinnahme durchführte, und somit mit unserer Versuchsdurchführung zu vergleichen ist.

Zur Messung der kumulativen Urinausscheidung wurde die Suspension 10,0 ml genau dosiert und der Harn 24 Stunden gesammelt. Die Urinproben wurden vor und nach saurer Hydrolyse vermessen. Eine Bestimmung vor der Hydrolyse ermöglicht Aussagen über den Metabolisierungsgrad von Sulfamethoxazol, da damit unverändertes Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol quantitativ erfaßt werden können. Durch die Bestimmung nach der Hydrolyse wird der Gesamtsulfamethoxazolgehalt einschließlich der konjugierten Metaboliten erhalten. Im 24-Stunden-Urin wurden nach Einnahme von Tabletten 48% Trimethoprim und 53,2% Sulfamethoxazol der Gesamteinnahme und nach Pipettendosierung der Suspension 46,4% Trimethoprim und 55,4% Sulfamethoxazol ausgeschieden. Dies zeigt, daß bei genauer Dosierung

keine Unterschiede der Bioverfügbarkeit in beiden galenischen Zubereitungen gefunden wurden. Bei der Dosierung von Co-trimoxazol Suspension mit dem Meßlöffel wurden von Trimethoprim 15% und von Sulfamethoxazol 19% weniger ausgeschieden.
Von dem ausgeschiedenen Sulfamethoxazol lagen ca. 70% als N-4-Acetylsulfamethoxazol und ca. 20% als freies Sulfamethoxazol vor. Die restlichen 10% werden konjugierten Metaboliten zugerechnet. Da die Werte des freien Sulfamethoxazols im Harn sehr stark schwanken -gefunden wurden 6,6% bis 33,2%- ist es sinnvoller, den Gesamtsulfamethoxazolgehalt nach vorhergehender Hydrolyse zu messen.

Als Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen kann festgehalten werden, daß bei Einnahme gleicher Co-trimoxazoldosen in Tabletten oder in Suspension nur geringfügige Abweichungen der Wirkstoffspiegel gefunden wurden. Diese etwas niedrigeren Werte nach Gabe der Suspension sind auf Ungenauigkeiten bei der Meßlöffeldosierung zurückzuführen. Es wäre deshalb sinnvoll, den Suspensionen Meßlöffel beizulegen, die eine genauere Dosierung ermöglichen.

IV Zusammenfassung

Zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Co-trimoxazol wurden vergleichende Messungen der Serenkonzentrationen und der kumulativen Urinausscheidungen von Trimethoprim und Sulfamethoxazol nach Tabletten - und nach Suspensionseinnahme durchgeführt. Dazu mußte zunächst eine HPLC-Methode erarbeitet werden, die eine Simultanbestimmung beider Komponenten neben dem Hauptmetaboliten des Sulfamethoxazols (N-4-Acetylsulfamethoxazol) in physiologischen Konzentrationen ermöglicht. Dies gelang auf RP-Säulen mit Acetonitril-Phosphatpuffer-Lösung (pH 5,4). Detektiert wurde bei 230 nm. Die Seren wurden vor der Probenaufgabe mit Perchlorsäure enteiweißt. Der Variationskoeffizient beträgt für Trimethoprim 2,7% und für Sulfamethoxazol 1,5%. Die Erfassungsgrenzen liegen bei 100 ng/ml für Trimethoprim und 500 ng/ml für Sulfamethoxazol. Diese Empfindlichkeit reicht aus, beide Stoffe über einen längeren Zeitraum im Serum zu erfassen und entsprechende Blutspiegelkurven zu erstellen.

Maximale Serumwerte -gemessen an 6 gesunden Probanden, deren Kreatininwerte im Serum und Harn überprüft wurden- ergaben sich 2 Stunden nach Einnahme von 160 mg Trimethoprim und 800 mg Sulfamethoxazol in Tabletten und Suspension. Sie lagen nach Einnahme der gleichen Dosis in der Suspension geringfügig niedriger.
Die Eliminationshalbwertszeiten von Trimethoprim und Sulfamethoxazol entsprachen sich erwartungsgemäß nach Einnahme der beiden galenischen Zubereitungen.

maximale Werte (µg/ml Serum)	Trimethoprim	Sulfamethoxazol
Tabletten:	1,52 ± 0,15	49,8 ± 2,7
Suspension:	1,44 ± 0,21	48,1 ± 7,3

	Trimethoprim	Sulfamethoxazol
Eliminierungshalbwertszeiten (h)		
Tabletten:	7,8	8,25
Suspension:	7,7	8,15

Die relative Bioverfügbarkeit der Suspension zur Tablette (Vergleich der Flächenintegrale unter den Blutspiegelkurven) beträgt 93,9% (Trimethoprim) bzw. 91,3% (Sulfamehtoxazol). Die Unterschiede dürften auf die Ungenauigkeiten bei der Dosierung (Meßlöffel) zurückzuführen sein, wie die Messung der kumulativen Urinausscheidung erkennen ließ.

Im 24-Stunden-Urin wurden in Bezug auf die Gesamteinnahme nach saurer Hydrolyse folgende Werte gemessen:

	Trimethoprim	Sulfamethoxazol
Gesamtausscheidung (%)		
nach Tablettendosierung	48,0 ± 8,2	53,2 ± 5,9
nach exakter Suspensiondosierung	46,4 ± 5,9	55,4 ± 4,9

Die Abweichungen bei der Dosierung der Suspension mit dem Meßlöffel waren größer. In diesem Fall wurden 15% Trimethoprim und 19% Sulfamethoxauol weniger ausgeschieden. Bei exakter Dosierung korrelieren die Werte.

V. Experimenteller Teil

Geräte:

Elektronenspektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckman Modell 24-Spektralphotometer erhalten. Schichtdicke der Quarzküvetten 10 mm.

Infrarot-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem Beckman AccuLab 2 Spektralphotometer erhalten. Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte in KBr-Preßlingen.

pH-Bestimmungen

Die Messung des pH der Pufferlösungen erfolgte mit dem Metrohm-Potentiograph Type 336 A Serie 18, ausgestattet mit einer Kombinationselektrode (Glas-Silber/Silberchlorid), Metrohm EA 121 UX.

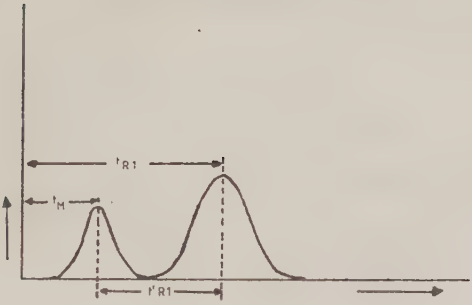
Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Für die HPLC-Chromatographie stand ein Flüssigkeitschromatograph hp 1010 A (identisch mit Hupe & Busch UFC 1000) zur Verfügung. Der Druck wurde durch eine Orlita Doppelkopfmembranpumpe DMP 1515/3 erzeugt. Die Proben wurden über eine 100 µl Rheodyne Schleife Modell 7120 auf die Säule gebracht.

Zur Integration der Peakflächen diente der Integrator hp 3370, der direkt mit dem Detektor verbunden war.

Zur Detektion wurde ein Schoeffel Zweistrahl UV Detektor mit variabler Wellenlänge , Spektroflow SF 770, ausgerüstet mit einer D_2-Lampe und einer Durchflußzelle mit 8 µl Zellvolumen, verwendet.

Verwendete chromatographische Parameter



t_M = die Totzeit der Trennsäule. Sie entspricht der Aufenthaltszeit der Substanzen in der mobilen Phase und ist für alle Stoffe gleich.

t_R = die Gesamtretentionszeit der Substanzen und setzt sich aus der Totzeit und der Nettoretentionszeit zusammen.

t'_R = die Nettoretentionszeit, die die Aufenthaltszeiten der Substanzen in oder an der stationären Phase bezeichnet.

Beim Vergleich von Retentionszeiten ist es notwendig, konstante Volumengeschwindigkeiten des Eluenten einzuhalten, da diese direkt davon abhängig sind. Daher ist

es besser, mit dem Kapazitäts- oder Massenverteilungsverhältnis k' zu arbeiten.

k' = das Kapazitäts- oder Massenverteilungsverhältnis gibt das Verhältnis der Aufenthaltszeiten in der stationären und der mobilen Phase an. k' ist von der Volumengeschwindigkeit und der Säulenlänge unabhängig.

$$k' = \frac{t'_R}{t_M}$$

Bei einer optimalen Trennung sollten die k' Werte zwischen 1,5 und 5 liegen.

α = Trennfaktor, der das Verhältnis zweier k' Werte bei konstanten äußeren Bedingungen und gleicher stationärer Phase bezeichnet.

$$\alpha = \frac{k'2}{k'1}$$

Der Trennfaktor ist ein Maß für die Selektivität eines Trennsystems. Je selektiver die stationäre Phase eine der beiden Komponenten festhält, desto größer ist der Wert α der beiden Komponenten. Für eine gute Trennung sollte $\alpha \gtrsim 1{,}5$ sein.

Füllen der Säulen

Teilchen mit einem Durchmesser $< 10\,\mu m$ werden am besten in Suspension in die mit Eluenten gefüllte Trennsäule eingeschlämmt, da hier die Trockenpackungsmethoden versagen. Gefüllt wurden die Säulen nach der "Slurry"[28]-Methode.
Die Apparatur zum Naßfüllen der Säulen bestand aus:

- der Mikro-Dosier-Membranpumpe Orlita DMP-AE 10,4, die einen Gegendruck von 500 bar zuläßt,

und

- einem Zylinder aus rostfreiem Stahl i.D. von 1,5 cm und einem Leervolumen von 38 ml.

Zum Naßfüllen wurden als Suspendiermittel zuerst Methanol, und dann später Tetrachlorkohlenstoff verwendet, da dies haltbarere Suspensionen ergab. Als Druckmittel wurde meist Methanol eingesetzt.

Testen der Säule

Die gepackten Säulen wurden vor der Benutzung getestet auf Trennstufenhöhe und Peaksymmetrie.

Als Testsubstanz wurde Nitrobenzol verwendet.

Die Trennstufenhöhen wurden aus den Chromatogrammen errechnet. Die Berechnung erfolgt nach Gleichung:

$$H = \frac{L}{5,54} \left(\frac{b_{0,5}}{t_R}\right)^2$$

Nach der Formel $N = \frac{L}{H}$ läßt sich nun auch die Trennstufenzahl berechnen.

Bei Peaks, die infolge Tailing oder Fronting unverhältnismäßig breit waren, wurde auch der Asymmetriefaktor berechnet. Es handelt sich um den Quotienten aus: Abstand des Lotes zur absteigenden Peakflanke/Abstand des Lotes zur aufsteigenden Peakflanke. Säulen mit einem Faktor >2 wurden nicht eingesetzt.

Reagenzien und Lösungsmittel

- Methanol, BASF, wurde über 50 cm Raschigringe fraktioniert destilliert.
- Ethanol Uvasol^R Merck
- Acetonitril LiChrosolv^R Merck für die Chromatographie das durch 1,5/um Filter filtriert wurde.
- LiChrosorb^R RP 8 10/um; 7/um
- 2 N-Perchlorsäure, hergestellt aus 6 N Perchlorsäure Merck
- Dinatriumhydrogenphosphatlösung 1/15 M, hergestellt durch Auflösen von 11,866 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat

zur Analyse ,Merck, in Wasser zu 1000 ml
- Kaliumdihydrogenphosphatlösung 1/15 M, hergestellt durch Auflösen von 9,073g Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, Merck, in Wasser zu 1000 ml
- Phosphatpufferlösungen wurden nach den Tabellen Merck[38)] durch Mischen von Kaliumdihydrogenphosphatlösung und Dinatriumhydrogenphosphatlösung hergestellt
- 1 N Salzsäure Merck
- 1 N Natronlauge Merck
- Wasser bidest

Arbeitsanweisung für die neu entwickelte HPLC-Bestimmungsmethode

- Fließmittel
  Zu einer Mischung von 15 ml 1/15 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung und 485 ml 1/15 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung werden 100 ml Acetonitril LiChrosolv^{R} Merck gegeben. Das Fließmittel wird vor Verwendung im Ultraschallbad entgast.

- Probenvorbereitung zur Bestimmung im Serum
  Zu 0,5 ml Serum werden 0,4 ml Wasser gegeben, gut durchmischt und dazu 0,1 ml einer 2 normalen Perchlorsäure gegeben. Diese Mischung wird 2 Minuten mit einem Blattrührer in einem Reagensglas 70 x 7/8 mm gemischt, anschließend 20 Minuten bei 5000 U/min. zentrifugiert und 100 µl des klaren Überstandes auf die Säule gegeben.

- Probenvorbereitung zur Bestimmung im Harn
  Bestimmung ohne vorherige Hydrolyse

  0,1 ml Harn werden mit 1 ml Wasser gut vermischt und 0,1 ml dieser Verdünnung direkt über eine Rheodyne^{R} Schleife auf die Säule gegeben.

  Bestimmung nach vorheriger Hydrolyse
  0,1 ml Harn werden mit 0,5 ml 1 N Salzsäure versetzt,

1 Stunde im Wasserbad bei 100°C erhitzt und anschließend mit 0,5 ml 1 N Natronlauge neutralisiert. Von dieser Lösung werden 0,1 ml auf die Säule gespritzt.

Tabellen zu den Abbildungen und statistischen Daten

Zu Abb.1 und 2

Tab.14 Extinktion- $E^{1\%}_{1cm}$ und ε -Werte von Sulfamethoxazol bei verschiedenen Wellenlängen. 1 mg SMZ in 100 ml Methanol (SMZ = Sulfamethoxazol)

nm	E	$E^{1\%}_{1cm}$	ε
300	0,107	107	2710
290	0,275	275	6966
280	0,465	465	11779
270	0,62	620	15705
266	0,632	632	16009
260	0,570	570	14438
250	0,349	349	8840
240	0,202	202	5116
235	0,202	202	5116
230	0,260	260	6586
225	0,375	375	9043
220	0,535	535	13552
215	0,685	685	17351
210	0,780	780	19758

Tab.15 Extinktion- $E^{1\%}_{1cm}$ und ε-Werte von Trimethoprim bei verschiedenen Wellenlängen. 0,1 mg TMP in 100 ml Methanol. (TMP = Trimethoprim)

nm	E	$E^{1\%}_{1cm}$	ε
300	0,003	30	870,9
290	0,010	100	2903
280	0,018	180	5226
270	0,021	210	6097
260	0,018	180	5226
250	0,025	250	7258
245	0,038	380	11032
240	0,056	560	16258
235	0,073	730	21193
230	0,086	860	24968
225	0,097	970	28161
220	0,105	1050	30483
215	0,122	1220	35419
210	0,153	1530	44419

Zu Abb.3

Tab.16 Retentionszeiten, k' und α-Werte von Trimethoprim bei Verwendung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen.

Methanolgehalt %	t_M	t_R	k'	α	Trennung
33,3	0,6	11,02	17,42	7,17	+
50	0,6	3,9	5,52	6,99	+
66,6	0,6	2,99	4,0	12,50	+
75	0,6	3,12	4,21	15,59	+

Tab.17 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Sulfamethoxazol bei Verwendung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen.

Methanolgehalt %	t_M	t_R	k'	α	Trennung
33,3	0,6	2,05	2,43	7,17	+
50	0,6	1,07	0,79	6,99	+
66,6	0,6	0,79	0,32	12,50	+
75	0,6	0,76	0,27	15,59	+

Die α-Werte in den Tabellen beziehen sich immer auf Sulfamethoxazol/Trimethoprim.

Zu Abb.4

Tab. 18 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Trimethoprim in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,01 M.

Methanolanteil	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	5,67	8,45	1,77	+
0,33	0,6	3,23	4,38	2,39	+
0,50	0,6	1,86	2,10	3,00	+
0,66	0,6	1,96	2,27	7,09	+
0,75	0,6	2,24	2,73	6,35	+

Tab.19 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Trimethoprim in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,05 M.

Methanolanteil	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	4,02	5,70	1,23	+
0,33	0,6	2,28	2,80	1,29	+
0,50	0,6	1,39	1,32	2,32	+
0,66	0,6	1,34	1,23	5,35	+
0,75	0,6	1,86	2,10	11,67	+

Tab. 20 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Trimethoprim in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,1 M.

Methanolanteil	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	3,15	4,25	1	-
0,33	0,6	1,89	2,15	1	-
0,50	0,6	1,19	0,98	1,01	-
0,66	0,6	1,09	0,82	1,74	+
0,75	0,6	1,17	0,95	3,39	+

Tab.21 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Trimethoprim in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,3 M.

Methanolanteil	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	3,07	4,12	1,02	-
0,33	0,6	1,87	2,12	1,05	-
0,55	0,6	0,97	0,62	1	-
0,66	0,6	0,94	0,57	1,36	+
0,75	0,6	0,94	0,57	1,78	+

Tab.22 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Trimethoprim in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,5 M.

Methanolanteil	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	2,99	3,98	1	-
0,33	0,6	1,7	1,83	1,14	-
0,50	0,6	0,98	0,63	1,22	-
0,66	0,6	0,87	0,45	1,18	-
0,75	0,6	0,93	0,55	1,57	+

Zu Abb.5

Tab.23 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Sulfamethoxazol in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke 0,01 M.

Methanolanteil	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	3,46	4,77	1,77	+
0,33	0,6	1,7	1,83	2,39	+
0,50	0,6	1,02	0,70	3,00	+
0,66	0,6	0,79	0,32	7,09	+
0,75	0,6	0,86	0,43	6,35	+

Tab.24 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Sulfamethoxazol in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,05 M.

Methanolgehalt	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	3,39	4,65	1,23	+
0,33	0,6	1,9	2,17	1,29	+
0,50	0,6	0,94	0,57	2,32	+
0,66	0,6	0,74	0,23	5,35	+
0,75	0,6	0,71	0,18	11,67	+

Tab.25 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Sulfamethoxazol in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,1 M.

Methanolgehalt	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	3,15	4,25	1	-
0,33	0,6	1,89	2,15	1	-
0,50	0,6	1,18	0,97	1,01	-
0,66	0,6	0,87	0,47	1,74	+
0,75	0,6	0,77	0,28	3,39	+

Tab.26 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Sulfamethoxazol in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,3 M.

Methanolanteil	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	3,12	4,20	1,02	-
0,33	0,6	1,81	2,02	1,05	-
0,50	0,6	0,97	0,62	1	-
0,66	0,6	0,85	0,42	1,36	+
0,75	0,6	0,79	0,32	1,78	+

Tab.27 Retentionszeiten, k'- und α-Werte von Sulfamethoxazol in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Phosphorsäurestärke von 0,5 M.

Methanolanteil	t_M	t_R	k'	α	Trennung
0,25	0,6	2,99	3,98	1	-
0,33	0,6	1,85	2,08	1,14	-
0,50	0,6	1,06	0,77	1,22	-
0,66	0,6	0,83	0,38	1,18	-
0,75	0,6	0,81	0,35	1,57	+

Zu Abb.11

Tab.28 k'-Werte von Trimethoprim, Sulfamethoxazol und dem Serumpeak in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei gleichbleibendem pH des Phosphatpuffers 5,3.

Methanolanteil	k' Trimethoprim	k' Sulfamethoxazol	k' Serum
0,20	21,39	13,71	2,94
0,30	8,07	6,37	2,16
0,40	4,00	3,21	1,36

Zu Abb. 13

Tab.29 k'-Werte von Trimethoprim, Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol in Abhängigkeit vom pH des Phosphatpuffers bei gleichbleibendem Methanolanteil von 0,3.

pH	k' TMP	k' SMZ	k' AcSMZ
4,9	6,37	6,89	16,37
5,0	6,37	6,37	12,16
5,1	6,50	5,84	10,45
5,2	6,50	5,45	9,53
5,3	6,63	5,05	8,21

Zu Abb.17

Tab.30 k'-Werte von Trimethoprim, Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol und dem Serumpeak in Abhängigkeit vom Ethanolgehalt bei pH 5 des Phosphatpuffers.

Ethanolanteil	k' TMP	k'SMZ	k' AcSMZ	k' Serum
0,20	1,63	2,82	4,79	1,71
0,15	2,16	3,61	6,89	1,71
0,12	3,00	5,05	11,11	1,71
0,11	3,74	5,71	13,87	1,71
0,10	5,3	7,42	17,03	1,71

Zu Abb.22

Tab.31 Werte zu den Eichgeraden für Trimethoprim bei 210,220 und 230 nm. Einheit cm.

Wellenlänge	1000	500	200	100	ng/ml
210 nm	11,6	5,75	2,1	1,2	
	11,5	5,95	2,05	1,15	
220 nm	7,1	3,4	1,3	0,7	
	7,1	3,3	1,5	0,7	
230 nm	5,5	2,75	1,2	0,5	
	5,55	2,65	1,15	0,6	

Zu Abb.23

Tab.32 Werte (cm) zu den Eichgeraden für Sulfamethoxazol bei 210, 220 und 230 nm.

Wellenlänge	10	30	50	70	/ug/ml
210 nm	6,6	20,3	33,9	45,2	
	6,75	20,1	33,7	44,9	
220 nm	4,4	13,28	21,15	29,0	
	4,45	13,30	21,05	29,5	
230 nm	2,48	7,65	12,48	16,67	
	2,49	7,55	12,35	16,95	

Zu II.4.

Tab.33 Berechnung der Standardabweichung von Trimethoprim und Sulfamethoxazol in Serie. Vorgegeben wurden 1000 ng Trimethoprim und 50 µg Sulfamethoxazol.

Gef. Trimethoprim		Gef. Sulfamethoxazol	
ng	Gehalt %	µg	Gehalt %
1000	100	50,54	101,1
1024	102,4	49,65	99,3
1012	101,2	50,95	101,9
1048	104,8	50,71	101,4
987,8	98,8	50,38	100,8
993,9	99,4	50,52	101,0
1000	100	50,18	100,4
987,8	98,8	50,16	100,3
1012	101,2	50,90	101,8
1000	100	50,39	100,8
$\bar{x}$ = 1006,5	100,7	$\bar{x}$ = 50,44	100,9
s = 18,48	1,85	s = 0,39	0,8

Tab.34 Berechnung der Standardabweichung von Tag zu Tag. Vorgegeben wurden 1000ng Trimethoprim und 50 µg Sulfamethoxazol.

	Gef. Trimethoprim ng	Gehalt %	Gef. Sulfamethoxazol µg	Gehalt %
1.Tag	938,30	93,8	51,25	102,5
2.Tag	1012,30	101,2	50,61	101,2
3.Tag	1024,70	102,5	49,41	98,8
4.Tag	956,89	95,7	49,73	99,5
5.Tag	1000,0	100,0	51,70	103,4
6.Tag	1012,3	101,2	49,55	99,1
7.Tag	975,3	97,5	51,02	102,0
8.Tag	987,7	98,8	49,56	99,1
9.Tag	1000,0	100,0	50,61	101,2
10.Tag	1006,2	100,6	50,32	100,6
11.Tag	1061,7	106,2	49,69	99,4
12.Tag	962,9	96,3	50,94	101,9
13.Tag	938,3	93,8	49,49	99,0
14.Tag	1024,7	102,5	50,04	100,1
15.Tag	1037,0	103,7	49,66	99,3
16.Tag	1000,0	100,0	50,38	100,8
17.Tag	1012,0	101,2	48,77	97,5
18.Tag	993,8	99,4	49,95	99,9
19.Tag	1012,0	101,2	50,00	100,0
20.Tag	1000,0	100,0	49,49	99,0
	$\bar{x}$ = 997,8	99,8	$\bar{x}$ = 50,11	100,2
	s = 31,27	3,13	s = 0,73	1,5

Tab 35 Wiederfindungsrate der Arzneistoffe im Serum nach Eiweißfällung mit Perchlorsäure. Dem Serum wurden 1000 ng Trimethoprim/ml und 40 µg Sulfamethoxazol zugesetzt.

Gef. Trimethoprim ng	Gehalt %	Gef. Sulfamethoxazol µg	Gehalt %
772,5	77,3	36,12	90,3
806,1	80,6	35,80	89,5
759,1	75,9	35,66	89,2
806,1	80,6	35,38	88,5
831,3	83,1	34,63	86,6
759,1	75,9	35,83	89,6
806,1	80,6	35,96	89,9
755,7	75,6	35,31	88,3
760,8	76,1	34,45	86,1
775,9	77,6	34,77	86,9
$\bar{x}$ = 783,27	78,3	$\bar{x}$ = 35,39	88,5
s = 26,82	2,7	s = 0,59	1,5

Zu III 1.3.

Tab.36 Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen nach Einnahme von Trimethoprim Tabletten geordnet nach Stunden der Probenentnahme in ng/ml Serum.

	1	2	3	6	10	14	18 h
E.U.	738	1458	1350	1059	872	472	392
S.N.	1537	1557	1428	1176	961	598	403
H.S.	1148	1254	1149	807	540	283	190
N.M.	1207	1610	1433	1023	668	416	283
F.B.	1675	1692	1455	1100	797	549	441
I.R.	1407	1563	1322	1031	894	628	501
Mittelwert $\bar{x}$	1285	1522	1356	1032	788	491	368
Standardab. s	333	152	114	124	157	128	113

Tab.37 Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen nach Einnahme von Trimethoprim Suspension geordnet nach Stunden der Probenentnahme in ng/ml Serum.

	1	2	3	6	10	14	18 h
E.U.	1049	1755	1574	1202	884	528	437
S.N.	1271	1418	1235	1120	922	557	323
H.S.	1042	1136	918	731	494	288	177
N.M.	1148	1324	1120	914	583	344	194
F.B.	1577	1598	1364	1146	826	552	367
I.R.	1033	1419	1074	933	772	540	428
Mittelwert $\bar{x}$	1186	1444	1214	1007	746	484	321
Standardab. s	212	215	232	179	171	119	113

Tab.38 Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen nach Einnahme von Sulfamethoxazol Tabletten geordnet nach Stunden der Probenentnahme in /ug/ml.

	1	2	3	6	10	14	18 h
E.U.	15,2	52,6	50,3	40,2	28,8	23,9	15,2
S.M.	28,6	49,5	48,5	39,8	30,9	22,8	14,8
H.S.	27,4	46,7	40,0	29,8	21,3	16,5	11,1
N.M	28,3	50,3	50,5	39,0	27,0	20,1	12,3
F.B	40,7	52,0	47,9	36,3	23,7	18,2	12,3
I.R.	33,1	46,7	47,3	32,3	22,1	15,5	11,2
Mittelwert $\bar{x}$	28,9	49,8	47,4	36,2	25,6	19,5	12,8
Standardab. s	8,3	2,7	3,9	4,3	3,86	3,4	1,8

Tab.39 Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen nach Einnahme von Sulfamethoxazol in Suspension geordnet nach Stunden der Probenentnahme in /ug/ml.

	1	2	3	6	10	14	18 h
E.U.	33,7	58,4	53,5	40,7	28,1	20,7	14,3
S.M.	40,9	50,4	42,2	36,6	28,4	19,9	14,2
H.S.	26,9	36,7	32,6	23,2	17,1	13,1	8,8
N.M.	31,9	45,4	41,2	28,9	20,5	14,6	9,6
F.B.	31,6	51,7	45,5	36,5	25,2	20,1	14,2
I.R.	26,0	46,0	37,8	31,0	22,4	16,3	9,5
Mittelwert $\bar{x}$	31,8	48,1	42,1	32,8	23,6	17,5	11,8
Standardab. s	5,4	7,3	7,1	6,3	4,5	3,2	2,7

Zu III 1.3.4

Tab.40 Eliminationshalbwertszeiten von Trimethoprim und Sulfamethoxazol (T = Tabletten, S = Suspension, h = Stunden)

Proband		Trimethoprim	Sulfamethoxazol
E.U.	T	8,1 h	9,2 h
	S	7,7 h	7,9 h
S.N.	T	8,4 h	9,35 h
	S	8,0 h	9,2 h
H.S.	T	5,8 h	8,05 h
	S	6,2 h	8,04 h
N.M.	T	6,3 h	7,88 h
	S	5,9 h	7,4 h
F.B.	T	8,2 h	7,71 h
	S	7,8 h	8,8 h
I.R.	T	10,2 h	7,4 h
	S	10,0 h	7,7 h

Zu III 2.3.

Abb.41 Gehalt an Trimethoprim, freiem Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol im 24-Stunden-Urin nach Einnahme von 2 Tabletten Co-trimoxazol. Der Urin wurde nicht hydrolisiert.

Proband	Trimethoprim		freies Sulfamethoxazol		N-4-Acetylsulfamethoxazol	
	µg/ml	mg gesamt	µg/ml	mg gesamt	µg/ml	mg gesamt
B.R.	64,3	82,3	63,2	80,9	294,5	376,9
G.J.	69,9	86,0	45,5	56,2	277,6	342,8
F.R.	50,8	88,9	21,6	37,8	234,9	411,1
G.L.	37,5	73,5	69,4	136,0	167,0	327,3
A.S.	50,0	55,9	97,6	133,2	197,0	269,3
S.K.	35,4	64,2	77,0	139,7	181,8	330,0

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen betragen:

Trimethoprim	$\bar{x}$ 75,1 mg	s 13 mg
Sulfamethoxazol	$\bar{x}$ 97,3 mg	s 44,9 mg
N-4-Acetylsulfamethoxazol	$\bar{x}$ 342,9 mg	s 48,2 mg

Berechnet in Prozent der Gesamteinnahme wurden im 24-Stunden-Urin ausgeschieden:

Trimethoprim	47% $\pm$ 8,2%
freies Sulfamethoxazol	12,2% $\pm$ 5,6%
N-4-Acetylsulfamethoxazol berechnet als Sulfamethoxazol	36,8% $\pm$ 5,2%
Gesamtsulfamethoxazol vor Hydrolyse.	49%

Der Gesamtsulfamethoxazolgehalt wurde durch Addition von freiem Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol, berechnet als Sulfamethoxazol, erhalten.

Tab.42 Gehalt an Trimethoprim, freiem Sulfamethoxazol und N-4-Acetylsulfamethoxazol im 24-Stunden-Urin nach Einnahme von 2 Meßlöffeln Co-trimoxazol Suspension. Der Urin wurde nicht hydrolysiert.

Proband	Trimethoprim		freies Sulfamethoxazol		N-4-Acetylsulfamethoxazol	
	µg/ml	mg gesamt	µg/ml	mg gesamt	µg/ml	mg gesamt
B.R.	130,4	78,0	71,9	43,0	544,4	325,5
G.J.	61,3	70,2	50,1	57,4	219,1	250,9
F.R.	29,0	66,3	19,2	44,0	121,0	277,0
G.L.	33,4	58,0	54,3	94,2	158,6	275,2
A.S.	52,9	52,6	106,8	106,2	269,2	267,8
S.K.	36,4	56,0	96,7	148,7	153,3	235,8

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen betragen:

Trimethoprim	$\bar{x}$	63,5 mg	s	9,7 mg
Sulfamethoxazol	$\bar{x}$	82,2 mg	s	41,8 mg
N-4-Acetylsulfamethoxazol	$\bar{x}$	272,0 mg	s	30,6 mg

Berechnet in Prozent der Gesamteinnahme werden im 24-Stunden-Urin ausgeschieden:

Trimethoprim	39,7% ± 6%
freies Sulfamethoxazol	10,3% ± 5,2%
N-4-Acetylsulfamethoxazol berechnet als Sulfamethoxazol	29,2% ± 3,3%
Gesamt Sulfamethoxazol vor Hydrolyse	39,5%

Berechnet auf die Gesamtausscheidung wurden nach der Dosierung mit dem Meßlöffel ca. 15% weniger Trimethoprim und ca. 19% weniger Sulfamethoxazol ausgeschieden.

Synthese von N-4-Acetylsulfamethoxazol

1 g Sulfamethoxazol wird in 50 ml Aceton gelöst. Dazu wird unter Rühren langsam 4 ml Acetylierungsgemisch, bestehend aus Acetanhydrid und Essigsäure 1+1, zugegeben. Man läßt eine Stunde weiterrühren. Es fällt eine weiße Masse aus. Das Rohprodukt wird zweimal aus Aceton umkristallisiert und mehrmals mit kaltem Aceton nachgewaschen. Die erfolgreiche Acetylierung zeigte das ^{1}H-NMR-Spektrum und das IR-Spektrum. Die vollständige Umsetzung des Sulfamethoxazols wurde mittels DC und HPLC überprüft.

VI Literaturverzeichnis

1) C.W.Sigel, M.E.Grace und C.A.Nichol, in M.Finland und E.H.Kass : Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Microbiological, Pharmacological and Clinical Considerations, The University of Chicago Press, London, Chicago 1974, S.148
2) J.Rieder in 1) S.135
3) H.Nowak, Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik, Krankenhaus-Apotheke, 3, 23(1977)
4) M.Donike, P.W.Lücker und B.Simon, Arzneim.-Forsch. 27, 2373(1977)
5) A.Windorfer und F.Daschner, Muench.Med.Wochenschr. 119, 1475(1977)
6) R.E.Weinfeld und T.C.Macasieb, J.Chromatogr. 164, 73(1979)
7) M.C.Bach, O.Gold und M.Finland in 1) S.152
8) D.E.Schwartz und J.Rieder, Chemotherapy(Basel) 15, 337(1970)
9) T.B.Vree, Y.A.Hekster, A.M.Baars, J.E.Damsma und E.Van der Kleijn, J.Chromatogr. 146, 103(1978)
10) C.W.Sigel, M.E.Grace, C.A.Nichol und G.H.Hitchings, J.Pharm.Sci. 63, 1202(1974)
11) D.E.Schwartz, B.A.Koechlin und R.E.Weinfeld, Chemotherapy(Basel) 14,Suppl. 22(1969)
12) S.A.Kaplan, R.E.Weinfeld und T.L.Lee, J.Pharm.Sci. 62, 1865(1973)
13) E.Röder und W.Stuthe, Dtsch.Apoth.Ztg. 115, 1461(1975)
14) S.R.M.Bushby und G.H.Hitchings, Br.J.Pharmacol. Chemother. 33, 72(1968)
15) M.A.Brooks, J.A.F.de Silva und L.D'Arconte, Anal.Chem. 45, 263(1973)
16) C.W.Sigel und M.E.Grace, J.Chromatogr. 80, 111(1973)
17) A.Ghanem, M.Meshali und A.Foda, J.Pharm.Pharmacol. 31, 122(1979)
18) A.Bye und M.E.Brown, J.Chromatogr.Sci. 15, 365(1977)
19) D.G.Ferry und E.G.McQueen, Proc.Univ.Otago Med.Sch. 56/2, 46(1978)

20) R.W.Bury und M.L.Mashford, J.Chromatogr. 163, 114(1979)
21) P.Helboe und M.Thomsen, Arch.Pharm.Chem.Sci.Ed. 5, 453(1977)
22) A.C.Bratton und E.K.Marshall, J.Biol.Chem. 128, 537(1939)
23) K.Harzer, J.Chromatogr. 155, 399(1978)
24) H.Auterhoff und K.-A.Kovar, Identifizierung von Arzneistoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 3.Aufl.1977, S.145
25) Produktbeschreibung Eusaprim^{R}, Deutsche Wellcome GmbH Burgwedel
26) P.Siegmund, E.Schütte und F.Körber, Praktikum der Physiologischen Chemie, W.de Gruyter Verl. Berlin, 2.Aufl. 1970, S.22
27) F.Moll, Biochemische und biopharmazeutische Untersuchungsverfahren, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1974, S.1
28) H.Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, Springer Verl.Berlin, Heidelberg, New York, 1975, S.12,29,43
29) H.Böhme und K.Hartke, Ph.Eur.I/II-Komm., Govi-Verlag GmbH Frankfurt, 1976, S.97
30) L.Sachs, Angewandte Statistik, Springer Verl.Berlin, Heidelberg, New York, 5.Aufl.1978, S.159
31) Bekanntmachung der Bundesärztekammer, Dtsch.Ärztebl.68, 2228(1971)
32) DIN 58973 vom Oktober 1979
33) G.Löhberg, Kreatininbestimmung im Serum und Urin, zukünftige Dissertation
34) E.Gladtke, H.M. von Hattingberg, Pharmakokinetik, Springer Verl.Berlin, Heidelberg, New York, 1973, S.14
35) K.H.Fröming in Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, Schriftenreihe der Medizinisch Pharmazeutischen Studiengesellschaft E.V., Umschau Verl. Frankfurt, 1974, S.33
36) E.Merck, Klinisches Labor, Darmstadt, 12.Aufl.1974, S.325
37) R.Richterich, Klinische Chemie, S.Karger Verl. Basel, 4.Aufl. 1978, S.555
38) E.Merck, Puffersubstanzen, Pufferlösungen, Puffertitrisole^{R}, Darmstadt

Lebenslauf

Geboren:	am 26.Oktober 1949 in Konstanz
Verheiratet:	mit Barbara Repnik, geb.Schneller 3 Kinder
Eltern:	Vinzenz Repnik, Schmiedemeister und Berta Repnik, geb.Wieland

Schulischer Werdegang

Grundschule:	Volksschule Markelfingen Ostern 1956 bis Ostern 1960
Gymnasium:	Heinrich Suso Gymnasium Konstanz Ostern 1960 bis Juli 1961 Claretinerkolleg Weißenhorn September 1961 bis Juli 1966 Staatliches Gymnasium Günzburg September 1966 bis Juni 1969
Reifeprüfung:	28.Juni 1969

Beruflicher Werdegang:

Apothekenpraktikum:	Schwarzwald-Apotheke,Singen August 1969 bis Juli 1971
Pharm.Vorprüfung:	2. August 1971
Vorexaminierter:	August 1971 bis Oktober 1973 in der Schwarzwald-Apotheke,Singen
Studium der Pharmazie:	Universität Tübingen Oktober 1973 bis März 1977
Staatsexamen:	30. März 1977
Approbation:	26. April 1977
Apotheker:	April 1977 bis August 1977, in der Apotheke Hohentwiel, Singen
Beginn der vorliegenden Arbeit:	September 1977
Abschluß der Arbeit:	Februar 1980
Wiss. Hilfskraft:	April 1978 bis September 1978
Wiss.Angestellter:	seit Oktober 1978

Die vorliegende Arbeit wurde im September 1977 unter Anleitung von Professor Dr. K.-A.Kovar am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Februar 1980 abgeschlossen.

Für die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. K.-A.Kovar sehr herzlich.

Dem Direktor des Pharmazeutischen Institutes, Herrn Professor Dr. H.Auterhoff, danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791